

Original article

## Suppression of glycated protein cross-linking formation and cross-linking cleavage reaction of edible purple Chrysanthemum flower extract

Masayuki Yagi<sup>1)</sup>, Hideo Hara<sup>2,3)</sup>, Ryusuke Mifuru<sup>3)</sup>, Yoshiro Ishikura<sup>3)</sup>,  
Chieko Sakiyama<sup>1)</sup>, Yoshikazu Yonei<sup>1)</sup>

- 1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,  
Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan  
2) Graduate School of Life Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan  
3) Unial Co., Ltd., Tokyo, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9 (1): 7-14  
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## 食用紫菊花抽出物の糖化蛋白架橋形成抑制と架橋切断作用

八木雅之<sup>1)</sup>、原 英郎<sup>2,3)</sup>、三古隆輔<sup>3)</sup>、石倉喜郎<sup>3)</sup>、崎山智恵子<sup>1)</sup>、米井嘉一<sup>1)</sup>

- 1) 同志社大学生命医科学部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  
2) 北海道大学大学院生命科学院  
3) 株式会社ユニアル

### 抄録

糖化ストレス (glycative stress) による体内での終末糖化産物 (advanced glycation endproducts; AGEs) の蓄積は、老化や生活習慣病の進展や発症要因となる。特にAGEsの生成に伴う蛋白の架橋形成は組織を硬化させるため、生体機能の低下をもたらす。本研究では食用紫菊花 (edible purple Chrysanthemum flower) の有用性を蛋白の糖化架橋低減の観点から、糖化蛋白架橋形成抑制作用、糖化蛋白架橋分解作用、糖化反応中間体生成抑制作用、AGEs架橋分解作用、OPH活性増強作用を検証した。試料は食用紫菊花 (*Chrysanthemum morifolium*) の花から得られた50%エタノール抽出エキス (EE) を使用した。EEは試料濃度0.01~1.1 mg/mLにおいてリゾチームのdimer、trimerの生成を抑制した。EEは試料濃度11.4~56.8 mg/mLにおいてリゾチームdimerを分解した。EEはヒト血清アルブミン-グルコース糖化反応モデルにおいて、蛍光性AGEs、糖化反応中間体の生成を抑制した。この作用は糖化反応阻害剤であるアミノグアニジンと近似であった。さらに

連絡先：教授 八木雅之  
同志社大学生命医科学部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：原 英郎 h-hara@unial.co.jp; 三古隆輔 mifuru@unial.co.jp;  
石倉喜郎 ishikura@unial.co.jp; 崎山智恵子 csakiyam@mail.doshisha.ac.jp;  
米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2022; 9 (1): 7-14  
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

EEは1-phenyl-1,2-propanedione (PPD) の $\alpha$ ジケトン結合を分解モデルとしたAGEs架橋切断作用を有し、AGEsの分解作用を有するoxidized protein hydrolase (OPH) の酵素活性を増強した。EEの糖化蛋白架橋形成抑制作用は糖化反応中間体およびAGEsの生成抑制の関与が推定された。EEの糖化蛋白架橋分解作用はキク科植物に含まれる多種類の物質や紫菊花の色素成分の関与が推定された。EEは糖化によって架橋した蛋白を分解、除去することで蛋白の機能低下を修復する作用を有する可能性がある。

**KEY WORDS:** 終末糖化産物 (AGEs)、糖化蛋白架橋 (cross-linking formation in the glycated protein)、糖化架橋分解 (cross-linking cleavage in the glycated protein)、キク (*Chrysanthemum morifolium*)

## はじめに

糖化ストレスによる体内での終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) の蓄積は皮膚老化、糖尿病合併症、骨粗鬆症などの進展要因となる<sup>1,2)</sup>。特にAGEsの生成に伴う蛋白の架橋形成は組織を硬化させるため、生体機能の低下をもたらす。また糖化反応中間体である3-デオキシグルコソン (3-deoxyglucosone; 3DG) は蛋白架橋形成を促進する<sup>3,4)</sup>。生体内の糖化ストレスの抑制は抗糖化 (antiglycation) と呼ばれる。抗糖化には食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制、AGEsの分解などがある。糖化による蛋白架橋形成の観点では、食後高血糖の抑制、糖化反応の抑制が予防的、AGEsの分解が修復的対策となる。

AGEsの生成抑制作用を有する物質にはアミノグアニジン (aminoguanidine; AG) がある<sup>5,6)</sup>。しかしAGには貧血、肝障害、ビタミンB6欠乏症などの副作用がある。一方、糖化反応抑制作用はハーブティー<sup>7)</sup>、野菜<sup>8)</sup>、フルーツ<sup>9)</sup>など様々な食品素材に認められている。AGEs架橋分解作用を有する物質にはN-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB) が報告されている<sup>10)</sup>。PTBは糖化蛋白架橋構造の一種である $\alpha$ ジケトン結合を切断する<sup>11)</sup>。AGEsの $\alpha$ ジケトン架橋分解作用はロスマリン酸 (rosmarinic acid)<sup>12)</sup>、エラジタンニン類 (ellagitannin)<sup>13)</sup>、フラボノイド (flavonoid)<sup>14)</sup>など、植物に含まれる物質にも認められている。Oxidized protein hydrolase (OPH) は血液、肝臓、皮膚などの様々な組織に存在するプロテアーゼの一種で、アシル化蛋白のN末端アシル基の遊離とともにAGEsの分解作用を有することが報告されている<sup>15)</sup>。OPHの活性増強作用はハトムギ (Job's tears)、クマザサ (Kuma bamboo grass)、フェヌグリーク (fenugreek) など多種類のハーブ抽出物に認められている<sup>16,17)</sup>。

キク科植物 (Asteraceae) は世界に約25,000種 (species) 存在し、さまざまな地域で生育可能であるため農作物として多種が利用されている<sup>18)</sup>。レタス (Lettuce) (*Lactuca sativa*)、ゴボウ (burdock) (*Arctium lappa*)、カモミール

(chamomile) (*Matricaria recutita*) は代表的なキク科植物の作物であり、葉、根茎、花などが食用とされる。食用紫菊花はキク (*Chrysanthemum morifolium*) の品種 (form) として新潟では「かきのもと」、山形では「もってのほか」、「延命楽」と称され、御浸しやなます、天ぷら、お吸い物など様々な方法で食されている農作物である。

主に食用にされるキクの花には、延命楽を始めとする花弁が赤紫色の品種と、阿房宮 (abokyu) を始めとする黄色の品種がある。キクの花にはフラボノイド (flavonoids) が46物質、カフェ酸類 (caffeic acid derivatives) が17物質存在することが報告されている<sup>19)</sup>。食用紫菊花は、さらにデルフィニジン (delphinidin)、シアニジン (cyanidin) などの色素成分が含まれる。既にキクの花にはAGEs生成抑制作用<sup>20,21)</sup>、抗酸化作用<sup>22)</sup>、抗光老化作用<sup>23)</sup>が報告されている。健康な日本人女性12名が食用紫菊花粉末を1日あたり150 mg、8週間継続摂取した試験では、素材の安全性ならびに摂取前後で左頬の皮膚弾力指数に上昇傾向が認められた<sup>20)</sup>。これらはキクの花の有用性をAGEs生成予防の観点から検証したものである。本研究では食用紫菊花の有用性を糖化による蛋白の機能低下予防と修復の観点から、糖化蛋白架橋形成抑制作用、糖化蛋白架橋分解作用、糖化反応中間体生成抑制作用、AGEs架橋分解作用、OPH活性増強作用を検証した。なお、本論文では、2量体の糖化リゾチーム (glycated lysozyme) が単量体に切断され場合を糖化蛋白架橋切断、AGEs構造における $\alpha$ ジケトン結合 ( $\alpha$ -diketone bond) を切断する場合にはAGEs架橋切断作用と呼び、両者を区別した。

## 材料と方法

### 1) 試薬

使用した試薬は以下のメーカーから購入して使用した。N-フェナシルチアゾリウムブロミド (*N*-phenacylthiazolium bromide; PTB)、ヒト血清アルブミン (human serum albumins; HSA, lyophilized powder,  $\geq 96\%$ , agarose gel

electrophoresis)、メチルグリオキサール (methylglyoxal solution, 40 % in H<sub>2</sub>O; MGO) はSigma-Aldrich Japan (東京都目黒区)。1-フェニル-1, 2-プロパジオン (1-phenyl-1, 2-propanedione; PPD)、安息香酸 (benzoic acid)、リゾチーム塩酸塩 (卵白由来) (lysozyme, from Egg White) アミノグアニジン (aminoguanidine hydrochloride; AG)、2, 3-ジアミノナフタレン (2, 3-diaminonaphthalene; DAN)、グリオキサール (40 % glyoxal solution; GO)、は富士フィルム和光純薬工業 (大阪府大阪市)。3-デオキシグルコソン (3-deoxyglucosone; 3DG) は同仁化学研究所 (熊本県上益城郡)。2-40 % Mini-Protean TGX Precast gel はBio-Rad (Hercules, California, USA)。Acetyl-alanine p-nitroanilide (AAPA) はBachem (Bubendorf, Switzerland)、oxidized protein hydrolase (OPH) はacylamino-acid releasing enzyme をタカラバイオ (滋賀県大津市)。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工業またはナカライテスク (京都府京都市) から購入して使用した。

## 2) 試料

試料は食用紫菊花の花から50 % エタノール抽出にて得られた、えんめい楽エキス (edible purple Chrysanthemum flower extract; EE) を使用した (固形分22.7%)。EEは株式会社ユニアル (東京都板橋区) から提供を受けた。

## 3) 糖化蛋白架橋形成抑制作用

糖化蛋白架橋形成抑制作用は既報<sup>24, 25)</sup>を参考に、リゾチーム-グルコース糖化蛋白架橋モデルを使用した。反応液は5 mg/mL リゾチームと0.5 mol/L グルコースを含む0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に試料溶液を1/10量添加して作成した。反応液はリン酸緩衝液、リゾチーム溶液、グルコース溶液、試料溶液の全てを添加した溶液; (A)、Aのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液; (B)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液; (C)、Cのグルコース溶液の代わりに精製水を添加した溶液; (D)を作成し、60 °Cで40時間インキュベートした。

反応終了後の反応液は3kDaの限外ろ過膜 (Amicon Ultra-0.5 mL centrifugal filters Ultracel-3K; Merck, Darmstadt, Deutschland) を用いて遠心ろ過し、低分子物質を除去した。その後、反応液は4-20 % ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) に供した。泳動後のゲルはCBB Stain One (ナカライテスク、京都市中京区) で染色し、泳動像をPharos FX System (Bio-Rad) で画像化後、リゾチームのdimer (25.8 kDa)、trimer (40.5 kDa) のバンドの強度をImageJ (NIH, Maryland, USA) で解析した。糖化蛋白架橋形成抑制作用のポジティブコントロール物質はAGを使用した。

蛋白架橋形成抑制率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{蛋白架橋形成抑制率 (\%)} = \{1 - (A - B) / (C - D)\} \times 100$$

A-D; 各反応液 SDS-PAGEゲル染色像のリゾチーム dimer または trimer のバンド強度

## 4) 糖化蛋白架橋切断作用

糖化蛋白架橋切断作用は糖化リゾチーム (glycated lysozyme) を作成し、試料によるリゾチーム dimer の分解率を測定した。糖化リゾチームは1 mg/mL リゾチームと0.2 mol/L グルコースを含む0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を37 °C、16時間反応させた後、限外ろ過 (3kDa) により低分子物質を除去して作成した。反応液は0.5 mg/mL 糖化リゾチームを含む0.05 mmol/L リン酸緩衝液中に試料溶液を1/2量添加した溶液; (A)、Aの試料溶液の代わりに試料溶解液を添加した溶液; (B)を作成した。その後、反応液は37 °Cで16時間インキュベート後、反応液を限外ろ過膜 (3kDa) で遠心ろ過し、低分子物質を除去した。その後、反応液を前項と同様の方法でSDS-PAGEに供し、泳動後のゲルを染色し、画像化した後、反応液中リゾチーム dimer のバンド強度を解析した。糖化蛋白架橋切断作用のポジティブコントロール物質はPTBを使用した。

蛋白架橋切断率は以下の式に基づいて算出した。

$$\text{蛋白架橋切断率 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

A; 試料添加時のリゾチーム dimer のバンド強度

B; 試料の代わりに試料溶解液を添加した時のリゾチーム dimer のバンド強度

## 5) 糖化蛋白架橋形成抑制作用

糖化反応抑制作用の検証は既報<sup>26)</sup>を参考にHSA-グルコース糖化反応モデルを使用し、蛍光性 AGEs (fluorescent AGEs; F-AGEs) および糖化反応中間体として3DG、GO、MGOの生成抑制率を測定した。F-AGEs および糖化反応中間体量はインキュベート後の反応液中の濃度を測定した。糖化反応抑制作用のポジティブコントロール物質はAGを使用した。F-AGEsは既報<sup>26)</sup>に従い、AGEs由来蛍光 (励起波長370 nm / 蛍光波長440 nm) を測定した。糖化反応中間体は既報<sup>27, 28)</sup>に従い、糖化反応液200 μLを過塩素酸で除蛋白後、アルカリ条件下でDANを添加してラベル化後、3DG、GO、MGOをHPLCで測定した。F-AGEs および糖化反応中間体の生成阻害率 (%) は既報<sup>26)</sup>に従って算出した。さらに試料溶液3濃度の生成阻害率から50 % 生成阻害濃度 (half inhibitory concentration; IC<sub>50</sub>; mg/mL) を算出した<sup>26, 29)</sup>。IC<sub>50</sub>は値が小さいほど糖化反応抑制作用が強いことを示している。

## 6) AGEs 架橋切断作用の測定

AGEs架橋切断作用は既報<sup>30, 31)</sup>に従い、PPDをAGEs架橋モデル物質とし、試料によるPPDのαジケトン結合 (α-diketone bond) の切断率を測定した。反応液は、試料溶液、10 mmol/L PPD、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) を5 : 1 : 4の割合で混合し、37 °Cで8時間反応させた後、0.7 N 塩酸を添加して反応停止後、PPDのαジケトン結合が試料によって切断され、遊離した安息香酸量を既報と同様のHPLC条件で測定した<sup>31)</sup>。

AGEs架橋切断作用のポジティブコントロール物質には

PTBを使用した。AGEs架橋切断率はPPD分子の $\alpha$ ジケトン結合が切断されると、1 molのPPDから1 molの安息香酸が生成することから、以下に示した式で算出した。

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

A; 反応液中の安息香酸量

B; サンプル中の安息香酸量

C; 反応に供したPPD量

## 7) OPH 活性増強作用

OPH活性増強作用は既報<sup>16)</sup>に従い、試料溶液を1/25量添加した反応液(0.1 mol/L Tris-塩酸(pH 7.4)、2 mmol/L Acetyl-alanine *p*-nitroanilide (AAPA)、1 mU/mL OPH、試料抽出液) 250  $\mu$ Lを、37 °Cで60分間インキュベートし、OPHがAAPAを分解して遊離する*p*-nitroanilide (pNA)量を405 nmで吸光度測定した(S)。OPH活性測定のリファレンスには、試料溶液の代わりに水を反応液に添加して測定した(R)。OPH活性化率(%)はリファレンス反応(R)の反応開始直後(0分)からの60分間に遊離生成したpNA量を100%として、以下の式で算出した。

$$\text{OPH 活性化率 (\%)} = \{(S_{60} - S_0) / (R_{60} - R_0)\} \times 100$$

S; 試料溶液添加反応液のpNA濃度

R; リファレンス反応液のpNA濃度

60; 60分後

0; 反応開始直後(0分)

## 統計解析

測定値は3回測定の実験値の平均値 $\pm$ 標準偏差(standard deviation; SD)で示した。測定値の比較にはテューキー多重比較検定(Tukey's test)またはダネット多重比較検定(Dunnnett test)を用いた。統計解析結果は危険率5%未満を有意とした。

## 結果

### 1) 糖化蛋白架橋形成抑制作用

EEは試料濃度0.01~1.1 mg/mLにおいてリゾチームのdimer, trimerの生成を濃度依存的に抑制した(**Table 1**, **Fig. 1**)。0.1 mg/mLのEEとAGの蛋白架橋形成抑制率はリゾチームdimerが37.1 $\pm$ 3.4%(EE)、24.9 $\pm$ 8.8%(AG)、リゾチームtrimerが78.3 $\pm$ 8.1%(EE)、61.7 $\pm$ 14.1%(AG)で、EEとAGの作用に差異が認められなかった。

### 2) 糖化蛋白架橋切断作用

EEは試料濃度11.4~56.8 mg/mLにおいてリゾチームdimerを分解した(**Table 2**, **Figure 2**)。56.8mg/mLにおけるEEの蛋白架橋切断率(41.2 $\pm$ 9.9%)は5 mmol/LのPTB(切断率39.6 $\pm$ 4.6%)との作用に差異が認められなかった。

### 3) 糖化反応抑制作用

EEはHSA-グルコース糖化反応モデルにおいて、F-AGEs、糖化反応中間体(3DG, GO, MGO)の生成を抑制した(**Table 3**)。EEのF-AGEsおよび糖化反応中間体生成抑制作用におけるIC<sub>50</sub>値は0.076~0.157 mg/mLであった。AGのIC<sub>50</sub>値は0.064~0.172 mg/mLであり、近似値を示した。

### 4) AGEs 架橋切断作用

EEのAGEs架橋切断率は試料濃度0.06~5.68 mg/mLにおいて濃度依存的に増加した(**Fig. 3**)。5.68 mg/mLにおけるEEのAGEs架橋切断率(14.2 $\pm$ 0.02%)は5 mmol/L PTB(切断率40.5 $\pm$ 0.2%)の0.4倍であった( $p < 0.01$ )。

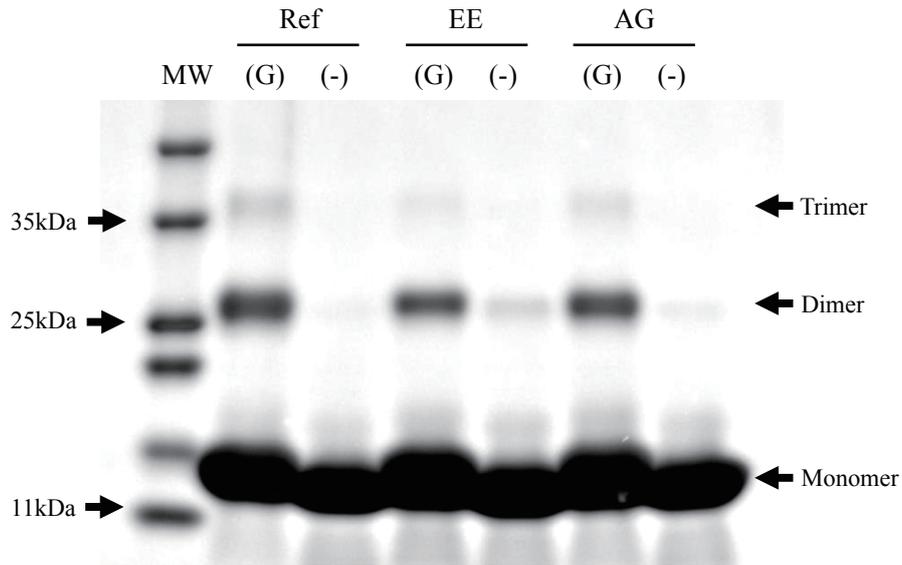
### 5) OPH 活性増強作用

EEは試料濃度0.9~181.6  $\mu$ g/mLにおいてOPH活性増強作用が認められた(**Fig. 4**)。OPHが最も活性化されたEE濃度は90.8  $\mu$ g/mL(173.1 $\pm$ 0.6%)であった。

**Table 1. Inhibitory effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on cross-linking formation in the lysozyme-glucose reaction model.**

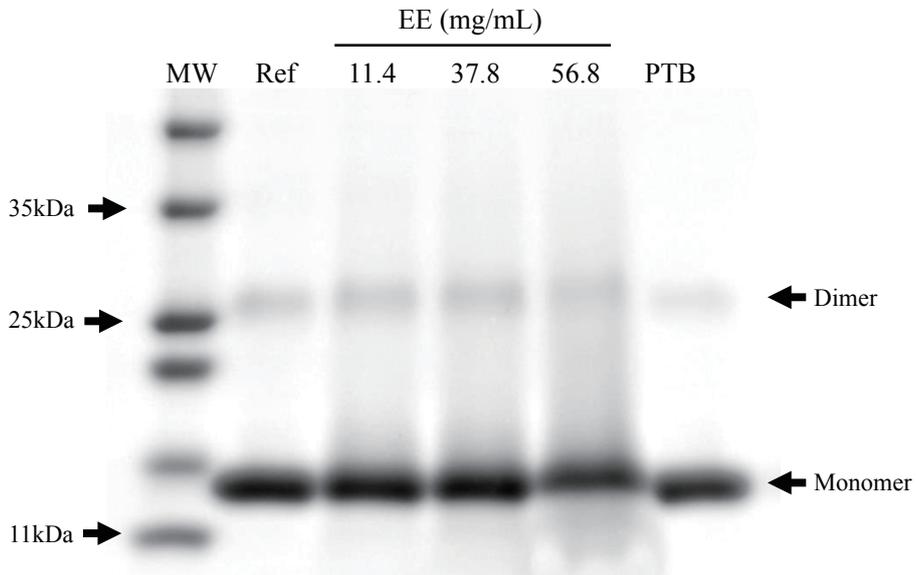
Sample	Conc. (mg/mL)	Inhibition ratio (%)	
		Dimer	Trimer
EE	0.01	-0.9 $\pm$ 8.8 **	30.4 $\pm$ 16.7 *
	0.1	37.1 $\pm$ 3.4	78.3 $\pm$ 8.1
	1.1	93.0 $\pm$ 6.6 **	95.4 $\pm$ 7.4 *
AG	0.1	24.9 $\pm$ 8.8	61.7 $\pm$ 14.1

5 mg/mL lysozyme were incubated at 60 °C for 40 hours. SDS-PAGE was conducted using 2-40% acrylamide gels. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, n = 3; Dimer, 25.8 kDa; Trimer, 40.5 kDa; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs AG by Dunnnett test; EE, edible purple Chrysanthemum flower extract; AG, aminoguanidine; Conc., concentration.



**Fig.1. Inhibitory effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on cross-linking formation in the lysozyme-glucose reaction model.**

5 mg/mL lysozyme were incubated at 60°C for 40 hours. SDS-PAGE was conducted using 2-40% acrylamide gels. MW, molecular weight markers; Ref, incubation without EE (with 50% ethanol); EE, incubation with 0.1 mg/mL edible purple Chrysanthemum flower extract; AG, incubation with 0.1 mg/mL aminoguanidine; (G), incubation with 0.5 mol/L glucose; (-), incubation without glucose.



**Fig.2. Cleavage effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on lysozyme dimer in the glycated lysozyme.**

1 mg/mL glycated lysozyme were incubated at 37°C for 16 hours. SDS-PAGE was conducted using 2-40% acrylamide gels. MW, molecular weight markers; Ref, incubation without EE (with 50% ethanol); EE, incubation with edible purple Chrysanthemum flower extract; PTB, incubation with 5 mmol/L *N*-phenacylthiazolium bromide.

**Table 2. Cleavage effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on lysozyme dimer in the glycated lysozyme.**

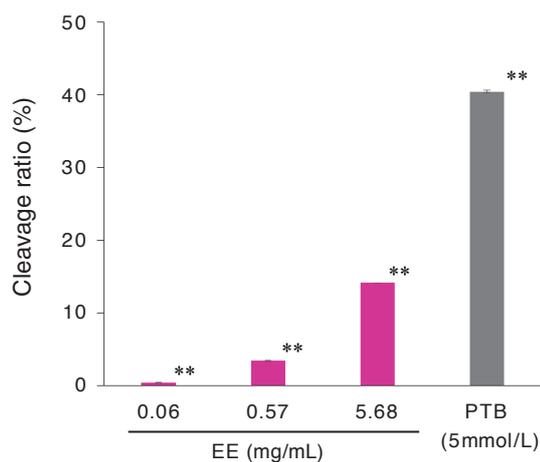
Sample	Conc. (mg/mL)	Cleavage ratio (%)
EE	11.4	-2.9 ± 1.6 **
	37.8	10.2 ± 4.7 **
	56.8	41.2 ± 9.9
PTB	5.0	39.6 ± 4.6

1 mg/mL glycated lysozyme were incubated at 37°C for 16 hours. SDS-PAGE was conducted using 2-40% acrylamide gels. Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 3; lysozyme dimer, 25.8kDa; \*\* p < 0.01 vs PTB by Dunnett test; EE, edible purple Chrysanthemum flower extract; PTB, *N*-phenacylthiazolium bromide; Conc., concentration.

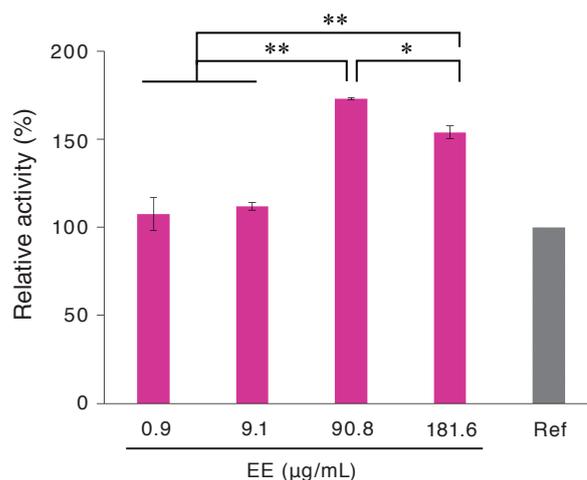
**Table 3. Inhibitory effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on fluorescent AGE in the HSA-glucose glycation model.**

Glycation products	Inhibition ratio (%)			IC <sub>50</sub> (EE) (mg/mL)	IC <sub>50</sub> (AG) (mg/mL)
	0.01 (mg/mL)	0.1 (mg/mL)	1.1 (mg/mL)		
Fluorescent AGEs	8.9 ± 0.7 **	65.3 ± 0.2 **	99.9 ± 0.3 **	0.076	0.064
3DG	4.0 ± 0.7 **	41.8 ± 0.6 **	86.8 ± 1.0 **	0.157	0.153
GO	-10.1 ± 1.2 **	88.0 ± 0.1 **	94.8 ± 0.1 **	0.081	0.073
MGO	2.8 ± 0.5 **	67.8 ± 1.2 **	85.7 ± 0.9 **	0.101	0.172

Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 3; \*\* p < 0.01 vs same glycation products by Tukey's test; IC<sub>50</sub>, half inhibitory concentration (mg/mL) on the HSA-glucose glycation model; EE, edible purple Chrysanthemum flower extract; AG, aminoguanidine; HSA, human serum albumin; AGE, advanced glycation end product; IC<sub>50</sub>, half-maximal inhibitory concentration.

**Fig. 3. Cleavage effect of edible purple Chrysanthemum flower extract on  $\alpha$ -diketone bond in the PPD reaction model.**

Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 3; \*\* p < 0.01 by Tukey's test; PPD, 1-phenyl-1,2-propanedione; EE, edible purple Chrysanthemum flower extract; PTB, *N*-phenacylthiazolium bromide.

**Fig. 4. OPH activation effect of edible purple Chrysanthemum flower extract.**

Data are expressed as mean ± standard deviation, n = 3; \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 by Tukey's test; EE, edible purple Chrysanthemum flower extract; Ref, water; OPH, oxidized protein hydrolase.

## 考察

### 1) 糖化蛋白架橋形成抑制作用と糖化反応抑制作用

生体内で生成するAGEsは多種類あり、蛍光性と非蛍光性あるいは架橋性と非架橋性に分類される。しかしAGEsの蛍光性と架橋性の有無には相互関係がない<sup>32)</sup>。F-AGEsにはアルグピリミジン (argpyrimidine)、ベスパリジン (vesperlysine)、ペントシジン (pentosidine) などがある。架橋性AGEsにはペントシジン、クロスリン (crossline)、グルコspan (glucosepane) などがある。また3DG、GO、MGOなどのジカルボニルやアルデヒドは糖化反応中間体として多種類のAGEsの生成促進因子となる。既に3DGは蛋白の架橋形成に関与することが報告されている<sup>3)</sup>。蛋白の架橋形成には3DGがリゾチーム、オボアルブミン (ovalbumin)、牛血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) のアルギニン、リジン残基を介したクロスリンカー (cross-linker) として作用する<sup>33)</sup>。

EEはリゾチーム-グルコース糖化反応系において蛋白の架橋形成を抑制するとともに、HSA-グルコース糖化反応モデル系においてF-AGEs、3DG、GO、MGOの生成を抑制した。これらの作用はAGと近似であった。AGは糖化反応中間体のジカルボニル基に結合し、蛋白の糖化を阻害する<sup>34)</sup>。EEはAGと同様に作用することで、糖化によるF-AGEsと架橋性AGEsの生成を抑制した可能性がある。食用紫菊花にはルテオリン (luteolin)、デルフィニジン、クロロゲン酸 (chlorogenic acid) などが含まれる<sup>20)</sup>。これらの物質は抗糖化作用<sup>20)</sup>と抗酸化作用<sup>22)</sup>の両方を有するため、EEの糖化蛋白架橋形成抑制への関与が推定された。

### 2) 蛋白架橋切断作用とAGEs架橋切断作用

糖化による蛋白架橋にはグルコspan、 $\alpha$ ジケトン ( $\alpha$ -diketone)、lysine-dihydropyridinium-lysineによるものがある<sup>11)</sup>。PTBは $\alpha$ ジケトン結合を切断する作用を有し、本作用によって糖化による蛋白の架橋を切断する<sup>30)</sup>。EEはAGEs架橋切断作用と糖化蛋白架橋分解作用の両方が、試料濃度依存的に認められた。AGEs架橋切断作用はザクロ抽出液に含まれるエラジタンニン (ellagitannin) およびシアニジン (cyanidin)、デルフィニジンおよびその配糖体に認められ、その作用にヒドロキシベンゼン (hydroxybenzene) 構造の関与が推定されている<sup>31)</sup>。

デルフィニジンは食用紫菊花の紫色成分物質の一種であり、EEの糖化蛋白架橋切断作用に関与した可能性がある。一方、PTBはマウスの尾コラーゲン (mouse tail tendon collagen) の糖化蛋白架橋分解に関与しなかったとの報告もある<sup>35)</sup>。PPDをモデル物質としたAGEs架橋切断作用と蛋白架橋切断作用は必ずしも一致しない。このためEEの糖化蛋白架橋分解作用は *in vivo* での検証が必要である。

### 3) OPH 活性増強作用

OPH活性増強作用は多種類のハーブティーに認められ、

キク科植物のチコリ (chicory) (*Cichorium intybus*)、タンポポ (dandelion) (*Taraxacum sp.*) など、葉や根を原材料としているものにも作用が報告されている<sup>16)</sup>。EEのOPH活性増強作用は原材料であるキク科植物に共通して含まれる物質の関与が推定された。

### 4) 食用紫菊花の蛋白架橋形成抑制、架橋分解の可能性

糖化ストレスの抑制には、食後高血糖の抑制、AGEsの生成抑制、AGEsの分解がある。また酸化ストレスはAGEs生成の加速要因であり、抗酸化作用も糖化ストレス抑制に寄与する<sup>1)</sup>。EEは糖化蛋白架橋形成抑制作用と共に、F-AGEs、3DG、GO、MGO生成抑制作用が認められた。またEEのこれらの作用は糖化反応阻害剤であるAGと近似であった。AGは1日あたり150~300 mgの継続摂取で糖尿病性腎症の改善傾向が報告されている<sup>16)</sup>。さらに食用紫菊花の色素成分であるデルフィニジン、シアニジン類は抗酸化作用を有する<sup>36, 37)</sup>。このためEEの継続摂取はAGと同様にAGEsの生成を抑制することで糖化蛋白架橋の形成を防ぐ可能性がある。

糖化ストレスによる架橋性AGEsの生成は蛋白の弾力性低下の要因となる<sup>1)</sup>。このためAGEsの蓄積は骨コラーゲンの硬化による骨折リスクの増大、関節可動域の縮小、皮膚のハリ低下、シワ生成、タルミの原因となる。糖化した蛋白はプロテアーゼによって分解されにくくなるため、組織の新陳代謝を遅らせる<sup>38)</sup>。

AGEs架橋切断作用とOPH活性増強作用の両方を有する混合ハーブ抽出物を健康な女性が12週間連続摂取した試験では、架橋性AGEsである血中ペントシジン量と顔のシワが減少した<sup>39)</sup>。食用紫菊花粉末を8週間継続摂取した試験では皮膚弾力の改善傾向が認められた<sup>20)</sup>。食用紫菊花粉末の50%エタノール抽出物であるEEにはAGEs架橋切断作用、糖化蛋白架橋分解作用、OPH活性増強作用が認められた。これらの結果から、EEの継続摂取は糖化によって架橋した蛋白を分解、除去し、蛋白の機能低下を予防、修復させる可能性がある。

## 研究限界

本研究で検証されたEEの糖化蛋白架橋形成抑制、糖化蛋白架橋分解作用などは *in vitro* での試験結果である。EEをヒトが継続摂取したときの糖化蛋白架橋抑制および分解作用の有用性は更なる検証が必要である。

## 結語

EEには糖化蛋白架橋形成抑制、糖化蛋白架橋分解作用が認められた。さらにEEにはF-AGEs、糖化反応中間体生成抑制作用、AGEs架橋切断作用、OPH活性増強作用

が認められた。EEがこれらの作用を有することから、糖化による蛋白の機能低下を防ぎ、修復させる可能性がある。

## 謝辞

本論文の出版にあたり医食同源生薬研究財団 (IDF# 22003) より支援を受けた。

## 利益相反申告

本研究の実施にあたり株式会社ユニアルより研究費の支援を受けた。

## 参考文献

- 1) Ichihashi M, Yagi M, Nomoto K, et al. Glycation stress and photo-aging in skin. *Anti-Aging Med.* 2011; 8: 23-29.
- 2) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 1. What is glycative stress? *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 152-155.
- 3) Kato H, Cho RK, Okitani A, et al. Responsibility of 3-deoxyglucosone for the glucose-induced polymerization of proteins. *Agric Biol Chem.* 1987; 51: 683-689.
- 4) Kato H, Dong Bum Shin DB, Hayase F. 3-Deoxyglucosone crosslinks proteins under physiological conditions. *Agric Biol Chem.* 1987; 51: 2009-2011.
- 5) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 232: 1629-1632.
- 6) Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, et al. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2004; 24: 32-40.
- 7) Hori M, Yagi Y, 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.
- 8) 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.
- 9) Parengkuan L, Yagi M, Matsushima M, et al. Anti-glycation activity of various fruits. *Anti-Aging Med.* 2013; 10: 70-76.
- 10) Vasan S, Zhang X, Zhang X. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. 1996; *Nature.* 382: 275-278.
- 11) Furber JD. Extracellular glycation crosslinks: prospects for removal. *Rejuvenation Res.* 2006; 9: 274-278.
- 12) Jean D, Pouligon M, Dalle C. Evaluation *in vitro* of AGE-crosslinks breaking ability of rosmarinic acid. *Glycative Stress Res.* 2015; 2: 204-207.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Yagi M, Ishigami M, Mori R, et al. Reduction effect of oxidized protein hydrolase (OPH) on advanced glycation end products and OPH-like activity in human stratum corneum. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 184-191.
- 16) 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.
- 17) Kawai H, Matsuo N, Yuasa E, et al. Investigation of herbal extracts that have both OPH activity enhancing action and AGE crosslink cleaving activity. *Glycative Stress Res.* 2019; 8: 39-44.
- 18) Rolnik A, Olas B. The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 3009.
- 19) Lin L, Harnly JM. Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry.* 2010; 120: 319-326.
- 20) Yagi M, Nomoto K, Hori M, et al. The effect of edible purple Chrysanthemum extract on advanced glycation end products generation in skin: A randomized controlled clinical trial and *in vitro* study. *Anti-Aging Med.* 2012; 9: 61-74.
- 21) Tsuji-Naito K, Saeki H, Hamano M. Inhibitory effects of Chrysanthemum species extracts on formation of advanced glycation end products. *Food Chemistry.* 2009; 116: 854-859.
- 22) Han A, Nam B, Kim B, et al. Phytochemical composition and antioxidant activities of two different color Chrysanthemum flower teas. *Molecules.* 2019; 24: 329.
- 23) 原 英郎, 佐藤 拓. 紫菊花 (えんめい楽) の抗糖化作用による美肌効果. *Food Style* 21. 2012; 16: 63-68.
- 24) Perera HKI, Ranasinghe HASK. A simple method to detect plant based inhibitors of glycation induced protein cross-linking. *Asian J Med Sci.* 2015; 6: 28-33.

- 25) Perera HKI, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15, 175.
- 26) 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.
- 27) Kusunoki H, Miyata S, Ohara T, et al. Relation between serum 3-deoxyglucosone and development of diabetic microangiopathy. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1889-1894.
- 28) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging: 2. The Evaluation of Glycative Stress: Measurement of blood glucose, glycated proteins and intermediates. *Glycative Stress Res.* 2016; 3: 205-209.
- 29) Yagi M, Yonei Y. Glycative stress and anti-aging. 4: The evaluation of glycative Stress: Evaluation for anti-glycative effect. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 87-92.
- 30) Vasan S, Zhang X, Zhang X. et al. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. 1996; *Nature.* 382: 275-278.
- 31) 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.
- 32) Rabbani N, Thornalley PJ. Glycation research in amino acids: a place to call home. *Amino Acids.* 2012; 42: 1087-1096.
- 33) Kato H, Cho RK, Okitani A, et al. Responsibility of 3-deoxyglucosone for the glucose-induced polymerization of proteins. *Agric Biol Chem.* 1987; 51: 683-689.
- 34) Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 1986; 27; 232: 1629-1632.
- 35) Yang S, Litchfield JE, Baynes JW. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 412: 42-46.
- 36) Estévez L, Mosquera RA. Molecular structure and antioxidant properties of delphinidin. *J Phys Chem A.* 2008; 112: 10614-10623.
- 37) Stintzing FC, Stintzing AS, Carle R, et al. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 6172-6181.
- 38) Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest.* 1981; 67: 1630-1635.
- 39) Matsuo N, Yuasa E, Kawai H, et al. Evaluation of the effects of mixed herb extract on skin based on anti-glycation effect: A randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Glycative Stress Res.* 2021; 8: 98-109.