

東海大学大学院令和5年度博士論文

生活習慣病の進行と関連する修飾アミノ酸
の生成を制御する天然物の探索と
その培養条件の検討

指導 永井 竜児 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

富永 悠幹

目次

抄録	3
緒言	5
第1章 植物の抽出物による AGEs 生成阻害効果の検討	
1. 背景	7
2. 実験方法	7
2-1. 実験材料	
2-2. 使用した植物材料	
2-3. 抽出方法	
2-4. ELISA を用いた CMA, CML 生成に対する各抽出物および 各成分の生成阻害作用の評価	
2-4-1. サンプル調製	
2-4-2. ELISA による CMA および CML の検出	
2-4-3. グリオキサール (GO) から生成される CMA 生成阻害能の評価	
2-5. <i>D. tokaiensis</i> 抽出物の調製	
2-6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用した <i>D. tokaiensis</i> 成分の単離	
2-7. 各成分の Nuclear magnetic resonance (NMR) による構造解析	
2-8. 統計分析	
3. 実験結果	11
3-1. 植物抽出物による AGEs 生成阻害作用	
3-2. <i>Drosera</i> 属 4 種による AGEs 生成阻害作用比較	
3-3. <i>D. tokaiensis</i> 抽出物 における活性画分の探索	
3-4. <i>D. tokaiensis</i> 抽出物 に含まれる AGEs 生成阻害成分の単離	
3-5. <i>D. tokaiensis</i> 抽出物より単離された成分の AGEs 生成阻害作用の検証	
3-6. <i>D. tokaiensis</i> 抽出物より単離された成分の GO 由来 AGEs 生成阻害効果の評価	
4. 考察	20
5. 小括	23

第2章 LEDを用いた組織培養における *D. tokaiensis* 中 AGEs 生成阻害効果および阻害成分物含量の変化

1. 背景	24
2. 実験方法	25
2-1. 使用した植物	
2-2. LEDを用いた <i>D. tokaiensis</i> の組織培養条件	
2-3. <i>D. tokaiensis</i> の抽出方法	
2-4. <i>D. tokaiensis</i> 粗抽出物の調整	
2-5. HPLCを用いた <i>D. tokaiensis</i> エキス中機能性成分の定量分析	
2-6. ELISAを用いた <i>D. tokaiensis</i> の CML および CMA 形成阻害作用の評価	
2-7. 統計分析	
3. 実験結果	27
3-1. <i>D. tokaiensis</i> 組織培養における単色 LED 光の影響	
3-2. 単色 LED 光条件下で生育した <i>D. tokaiensis</i> におけるフェノール類含量の変化	
3-3. 単色 LED 光条件下で培養した <i>D. tokaiensis</i> 由来抽出物の AGEs 阻害効果	
3-4. <i>D. tokaiensis</i> 組織培養の成長に及ぼす複合 LED 光条件の影響	
3-5. 複合色 LED 光条件下で培養した <i>D. tokaiensis</i> のフェノール類含量の変化	
3-6. 複合色 LED 光条件下で生育した <i>D. tokaiensis</i> の AGEs 形成阻害効果の変化	
4. 考察	36
5. 小括	38
総括	39
謝辞	41
参考文献	42
使用した器具・試薬	49
補足図および表	52

抄録

糖尿病や動脈硬化をはじめとする生活習慣病の発症・進展に伴って生体内ではグルコースを始めとした還元糖とタンパク質のアミノ基が非酵素的に反応するメイラード反応が進行する。本反応後期において終末糖化産物である **Advanced glycation end-products (AGEs)** が生成すると骨格タンパク質の変性や酵素の活性低下が進行することから、生活習慣病増悪の要因となる可能性が報告されている。したがって、AGEs の生成を阻害することで生活習慣病の発症の予防および進展の遅延が期待される。これまでに AGEs の生成阻害化合物としてアミノグアニジン (AG) が報告されているが、生体で十分な効果が認められないことや重篤な副作用が報告されていることから開発は中止されている。以上のことから本研究では、(1) AG よりも効果が高く、かつ病態の発症前より摂取が可能な植物に含まれる AGEs 生成阻害成分の探索を行った。また、抗糖化、抗酸化などの機能性を有する天然物を安定的に供給する方法の一つとして組織培養が挙げられる。これまでの植物の組織培養において、光源として白色蛍光灯が用いられていたのに対し、近年、耐久性や発光時に生じる熱が低温であることに加え、波長の選択制など蛍光灯よりも利点が多い、**Light Emitting Diode (LED)** へ移行しつつある。植物の培養における LED の効果は、様々な植物で研究がなされており、植物の収量増加や植物が生産する二次代謝産物の生産性向上などの報告がある。しかしながら、植物に対する LED の効果は、植物の種によって異なることから目的の植物に適した光条件を検討する必要がある。したがって、(2) AGEs 生成阻害効果を有する *Drosera tokaiensis* の組織培養時における光照射条件を変えて、活性成分並びに AGEs 生成阻害効果の変動を評価した。

(1) 植物由来 AGEs 生成阻害成分の探索：AGEs はメイラード反応の後期反応における酸化、脱水縮合によって生成される反応系に加え、グルコースが自己酸化することで生成されるグリオキサールとタンパク質からも生成される。そこで本研究では、酸化反応から生成される AGEs に着目し、抗酸化並びに抗炎症効果が報告されている植物 14 種から粗抽出物を調製し、**ribose** と **gelatin** の反応系を用いて、AGEs 構造である **N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML)** 及び **N^ω-(carboxymethyl)arginine (CMA)** の生成阻害効果をモノクローナル抗 AGEs 抗体を用いた **Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)** で評価した。その結果、食虫植物に分類され、ヨーロッパにおいて気管支感染症の民間療法で用いられる治療薬として利用されてきた歴史を有する *Drosera* 属に高い阻害効果が認められた。この *Drosera* 属のうち日本固有の種であり高い抗炎症効果が報告されている *Drosera tokaiensis* (*D. tokaiensis*)

に着目し、Diaion HP-20 による精製を行った後に High Performance Liquid Chromatography (HPLC) で活性成分を単離した。得られた画分を Nuclear Magnetic Resonance (NMR) を用いて構造解析を行った。その結果、CMA および CML の生成阻害成分として ellagic acid, myricitrin, 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside および quercitrin が同定された。また、これらフェノール類による AGEs 生成阻害効果は、メイラード反応の中間体であるグリオキサール由来の CMA 生成を阻害しなかったことから、グリオキサール由来 AGEs の生成を阻害する AG とは異なり、メイラード反応の後期反応における酸化反応や糖の自己酸化を阻害することによるものだと考えられた。本研究は、*in vitro* による評価であるが、AGEs 生成阻害効果で特に高い活性を示した ellagic acid は、糖尿病ラットにおいて蓄積が増加する CML の減少および腎機能の改善が報告されていることから *D. tokaiensis* についても糖尿病性腎臓病の発症および症状の進行を抑制する可能性が示唆された。

- (2) 光照射条件による活性成分の変動：培養時に照射する光条件の変化に伴った二次代謝産物の含量及び抗糖化能を検討するために、*D. tokaiensis* の培養に照射する光源を白色蛍光灯及び赤、緑、青を基調とした LED 光源を用いて単色もしくは複合色 (赤/緑、赤/青、緑/青、赤/緑/青) 条件下で *D. tokaiensis* の培養を行った。その後、得られた植物体からメタノールで粗抽出物を調整し、*D. tokaiensis* に含まれる 2 次代謝産物として ellagic acid、myricitrin、quercitrin に焦点を当て HPLC にて定量した。AGEs 生成阻害効果については、モノクローナル抗 CML もしくはモノクローナル抗 CMA 抗体を用いた ELISA 法で評価を行った。その結果、ellagic acid の含量が LED 照射条件下において色調に関係なく増加したのに対して myricitrin、quercitrin は単色光で培養することによってその含量が減少することが明らかとなった。しかしながら、赤/青もしくは赤/緑/青などの光を複合させた一部の条件下では myricitrin および quercitrin の含量減少が蛍光灯培養と同等まで回復することが明らかとなった。植物で生産されるフェノール類は、フェニルアラニンやチロシンから様々な酵素によって生合成されることから LED は、*D. tokaiensis* における ellagic acid の生合成に関与する酵素を活性化し、myricitrin や quercitrin などのフラボノイドの生合成に関与する酵素を抑制することが推察された。一方で、AGEs 生成阻害効果の検討では、蛍光灯培養と同等かそれ以上の CMA および CML 生成阻害効果を示した。特に、赤色光で培養することによって CML を効果的に阻害することが明らかとなった。以上のことから、LED は蛍光灯よりも費用対効果が高く、環境にも優しいため、*D. tokaiensis* 組織培養には蛍光灯の代わりに赤色を基調とした LED を使用することが推奨される。

緒言

近年社会問題の一つとなっている 2 型糖尿病やメタボリックシンドロームなどの生活習慣病は、偏った食習慣、運動不足、喫煙や過度な飲酒等の生活習慣が発症要因とされている。世界における糖尿病患者数は 2019 年において 4 億 6300 万人とされているが [1]、本疾患の合併症として、腎臓病、神経障害、網膜症等の細小血管障害や、脳血管疾患、冠動脈疾患、下肢閉そく性動脈硬化症等の大血管障害を引き起こし、健康寿命を著しく低下させることが知られている。また、高血圧や脂質異常症等に起因して発症する動脈硬化症は心血管疾患や脳血管疾患を引き起こすが、これら疾患は現在の日本人の死因第二位、第三位となっている [2]。以上のような生活習慣病に起因する血管障害の発症を予防・改善するためには、生活習慣の改善に加え、病態の進行を抑制しうる機能性成分を食生活に取り入れることも有効である。そこで、本研究では、生活習慣病の発症および進行に関与が考えられている AGEs に着目し、日常的に摂取可能な天然物由来の AGEs 生成阻害成分の探索・評価を行った。

生活習慣病の発症や進行の原因の 1 つとして、非酵素的修飾アミノ酸によるタンパク質の修飾が挙げられる。特に、糖尿病等によって生体内濃度が増加するグルコースやフルクトースなどの還元糖は、タンパク質と非酵素的に反応するメイラード反応によって AGEs を生成する。AGEs は、加齢に伴って徐々に蓄積されるが糖尿病などの発症に伴って蓄積が促進され [3, 4]、その病態や部位によって様々な構造体が報告されている。以上のことから、AGEs の生成を阻害することによって生活習慣病発症のリスク低減が期待される。近年、生活習慣病予防を目的とした AGEs 生成阻害成分のスクリーニングは世界的に行われているが、構造を明らかにした AGEs の正確な測定は困難であったことから、Sugawa *et al.* は複数の AGEs 構造の測定系および阻害アッセイ系を確立した [5]。特に本研究では、糖尿病 [6] およびその合併症である腎症 [7] などの疾患で蓄積が増加することが報告されている *N*^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) およびコラーゲンにおける主要な AGEs である *N*^ω-(carboxymethyl) arginine (CMA) [8] に着目し、AGEs 生成阻害成分のスクリーニングを行った。これまでに Kinoshita *et al.* によって 1 型糖尿病ラットに対してヒシ (*Trapa bispinosa*) 抽出物と多くの植物種に含まれる成分であるルテインの摂食試験により血清中 CML の蓄積が阻害され、白内障が予防されることを報告されている [9]。本報告は、AGEs によるタンパク質修飾の阻害が加齢性疾患の発症および進行を遅延させる可能性を示唆している。本研究では、抗酸化や抗炎症効果などの機能性が報告されている植物を用いて CMA および CML 生成に対する阻害効果を有する成分を探索した (第 1 章)。

1 章において CML、CMA 生成に対する高い阻害効果が認められた *Drosera tokaiensis* を含む *Drosera* 属は、食虫植物に分類され、オーストラリア、アフリカ、南アメリカを中心に世界中に分布しており、約 150 もの種が報告されている [10]。

特に、北半球に分布する *Drosera rotundifolia* L.、*D. intermedia* Hayne、*D. anglica* Huds のような種は、気管支感染症の治療における伝統的な治療薬として利用されてきた歴史がある [11]。しかしながら、これらの種は現在、絶滅の危機に瀕しており、ヨーロッパにおけるいくつかの種は法律によって保護されている。そのため、代替品としてアフリカやアジアに分布している *D. madagascariensis* DC や *D. peltata* Smith が用いられている [12]。また、日本固有の種である *D. tokaiensis* は、*D. rotundifolia* (DR) と *D. spatulate* (DS) の複二倍体雑種であり [13]、DR よりも強力な抗炎症効果が報告されていることから、ヨーロッパにおいて保護されている種の代替品の候補として挙げられている [14]。

植物の組織培養は、光や温度、培地組成などあらゆる環境を制御することが可能であることから、植物が生産する 2 次代謝産物を安定的に供給する方法として利用されてきた [15, 16]。

特に植物の培養における光の条件は、植物体が光合成を行う際の重要な要素の一つであり、成長速度や成分含量の変化に大きな影響を与えることから、植物培養における光条件の検討は、培養期間の短縮、機能性向上が期待できる [15, 17]。

加えて、これまでの植物の組織培養では、光源として白色蛍光灯が使用されていた。近年、耐久性、発光時に生じる熱が低温であることに加え、波長の選択性など、蛍光灯と比較して多くの利点がある発光ダイオード (LED) を用いた研究が盛んになっている。LED は、植物の代謝産物の増加に効果的であることが知られている。特に、青色 (450-500 nm) と赤色 (610-760 nm) の LED は、様々な植物の二次代謝産物生産の向上に利用されている [18, 19]。これまでの *D. tokaiensis* の組織培養において、1/2 Murashige and Skoog medium (1/2 MS 培地) および白色蛍光灯による培養系は確立されているものの、光波長の変化に伴った成分変動や機能性評価は十分なされていない。そこで本研究では、植物の組織培養における光波長に着目し、LED を用いた異なる波長で培養した *D. tokaiensis* 中に含まれるフェノール類含量の変化の比較を行うと同時に、抗糖化作用を AGEs の 1 種である CMA および CML の生成阻害効果をモノクローナル抗体を利用した ELISA 法を用いて評価した。

第1章 植物の抽出物による AGEs 生成阻害効果の検討

1. 背景

メイラード反応後期生成物である AGEs は、糖尿病を中心とした生活習慣病において生体における生成量および蓄積量が増加し、病態の発症や進行に関与することが報告されている。そのため、AGEs の生成および蓄積を阻害することは、生活習慣病の予防や改善に寄与すると考えられる。これまで様々な植物抽出物の AGEs 生成阻害作用が報告されてきたが [20-22]、阻害対象となる AGEs の構造が明確ではない研究も多く、阻害メカニズムは不明な点が多い。また、生活習慣病は日々の食生活や運動習慣の悪化に起因して発症および進行することから、AGEs 生成阻害成分による作用を効率的に得るためには、食品として摂取することが有効である。そこで、本研究では、過去の研究において抗酸化作用や抗炎症作用が報告され、食歴を有する植物を中心に AGEs 生成阻害成分の探索を行った。

2. 実験方法

2-1. 実験材料

実験に使用した器具および試薬は本紙の p.45 にまとめて記載した。

2-2. 使用した植物材料

抗酸化、抗炎症効果が報告されている食品として用いられる植物種を中心に、植物抽出物を以下 14 種使用した [23-33]。レモン (*Citrus limon*), オレガノ (*Origanum vulgare*), モリンガ (*Moringa oleifera*), パセリ (*Petroselinum crispum*), ヨモギ (*Artemisia indica var. maximowiczii*), シソ (*Perilla frutescens var. crispa*), カキドオシ (*Glechoma hederacea var. grandis*), ヒュウガトウキ (*Angelica furcijuga*), ショウガ (*Zingiber officinale*), バジル (*Ocimum basilicum*), タマネギ (*Allium cepa*), ビブリスアクアティカ (*Byblis aquatica*), ビブリスギガンテア (*Byblis gigantea*), モウセンゴケ (*Drosera rotundifolia*), トウカイコモウセンゴケ (*Drosera tokaiensis*), コモウセンゴケ (*Drosera spatulata*), イシモチソウ (*Drosera peltata*)。

Byblis aquatica, *Byblis gigantea*, *Drosera rotundifolia*, *Drosera tokaiensis*, *Drosera spatulata*, *Drosera peltata* の 6 種は、東海大学農学部農学科植物環境科学研究室で 2.5% スクロースおよび 0.2% ゲランガムを添加した 1/2 MS 培地で組織培養した培養体 (Fig. 1) を使用した [34]。

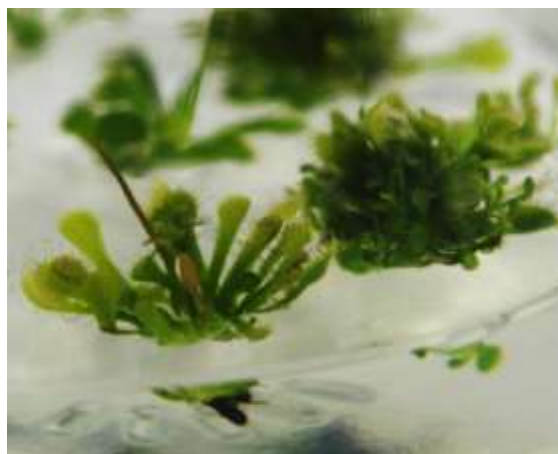


Fig. 1. *D. tokaiensis* の培養状況：2.5% スクロースおよび 0.2% ゲランガムを添加した 1/2 MS 培地を用いて培養した。

2-3. 抽出方法

それぞれの植物組織は、凍結乾燥後に破砕し、10-20 g に計量して 50 ml のメタノール (MeOH) を加え室温で 3 日間静置し、抽出を行った。また、*Byblis aquatica*, *Byblis gigantea*, *D. rotundifolia*, *D. tokaiensis*, *D. spatulata*, *D. peltata* は、破砕後 10-20 g 計り取り 50 ml の 80% MeOH を加え室温で 3 日間静置し、抽出を行った。これらの抽出物は濾紙によって濾過した後にエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥機を使用して乾燥した。得られた粉末状の粗抽出物を用いて ELISA による CMA および CML の生成阻害作用の評価を行った。

2-4. ELISA を用いた CMA, CML 生成に対する各抽出物および成分の阻害作用の評価

2-4-1. サンプル調製

各成分を 0.1 mM、1 mM、10 mM になるようにジメチルスルホキシド (DMSO) を用いて溶解させた。次に、0.2 mM リン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて、それぞれ 60 mM リボースおよび 4 mg/ml ゼラチンとなるように調製した。その後、クリーンベンチ内でリボースとゼラチンを混合させ、0.45 μ m フィルターを用いて滅菌処理を行った。処理後のリボース、ゼラチン溶液を 1.5 ml チューブに分注し、各濃度に調製した成分をリボース、ゼラチン溶液の 1/100 の液量になるように添加し、ボルテックスを用いて混合した。その後、37°C で 1 週間インキュベートし、反応後のサンプルにおける CMA および CML の生成阻害効果を ELISA で評価した。

2-4-2. ELISA による CMA および CML の検出

インキュベート後のサンプルを、ボルテックスを用いて混合し、タンパク濃度を 1 µg/ml、10 µg/ml にするため、それぞれ PBS で 2000 倍、200 倍に希釈し、イムノプレートに 100 µl/well 添加した。2 時間静置した後、200 µl/well の Washing Buffer を用いて洗浄操作を 3 回行った。その後、0.5% ゼラチンを 200 µl/well で添加し、ブロッキング操作を行った。1 時間静置後、洗浄操作を行い、CMA 抗体 1 µg/ml、CML 抗体 0.5 µg/ml となるように Washing Buffer で希釈された一次抗体をそれぞれ 100 µl/well で添加した。1 時間静置後、洗浄操作を行い、Washing Buffer を用いて 5000 倍希釈した IgG 抗体を二次抗体として 100 µl/well 添加した。1 時間静置後、洗浄操作を行い、常温の Substrate Buffer 10 ml、過酸化水素 6 µl、OPD tablet 1 錠を混合した発色液を 5 秒ごとに 100 µl/well で添加した。発色を目視で確認した後に 1 M 硫酸を反応停止液として 5 秒ごとに 100 µl/well で添加し、発色を停止させた。その後、プレートリーダーを吸光度 492 nm に設定し、吸光度の測定を行った。得られた吸光度値から以下の式に基づいて阻害率を計算した。

$$\text{阻害率 (\%)} = 100 - \{ (\text{サンプル-ブランク}) / (\text{コントロール-ブランク}) \times 100 \}$$

ブランク: 天然物未添加かつインキュベートしていないリボース、ゼラチン溶液

コントロール: 天然物未添加インキュベートしたリボース、ゼラチン溶液

2-4-3. グリオキサール (GO) から生成される CMA 生成阻害能の評価

GO-ゼラチンは、2 mg/ml のゼラチンと 500 µM の GO を 200 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で等量混合して調製した。その GO-ゼラチンに 100 µg/ml の成分を添加し、37°C で 3 日間インキュベートを行った後、非競合 ELISA で CMA 生成について評価した。

2-5. *D. tokaiensis* 抽出物の調整

D. tokaiensis 抽出物は、過去の報告 [11, 14] を参考に、Diaion HP-20 (Supelco, PA, USA) を用いて分画した。乾燥した粗抽出物を水で希釈し、Diaion HP-20 に通した後、カラムを水、20% MeOH、50% MeOH、70% MeOH、100% MeOH、およびアセトンで溶出した。溶出した画分はエバポレーターを用いて減圧濃縮し、凍結乾燥機で乾燥させた。得られた画分を用いて ELISA による CMA、CML 生成阻害効果の評価を行い、活性成分の絞り込みを行った。

2-6. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用した *D. tokaiensis* 成分の単離

2-5 によって分画された画分のうち、50% MeOH 画分中に含まれる成分の単離を HPLC にて行った。条件は以下のとおりである。HPLC (島津製作所、京都：システムコントローラー、CBM-20A、ポンプ、LC-20AD、UV 検出器、SPD-20A、オートサンプラー、SIL-20A、カラムオーブン、CTO-20AC)、注入量 20 μ l、Cosmosil パックカラム 5C18-AR-II (4.6 \times 250 mm; Nacalai Tesque Inc.、京都、日本)、カラムオーブン温度 40°C、移動相は、A 溶媒として 0.1% TFA を含む超純水、B 溶媒として 0.1% TFA を含む 60% アセトニトリル (ACN) を使用した。各成分の単離は UV 365nm で検出を行い、検出された 7 つの画分を回収することで行った。

2-7. 各成分の Nuclear magnetic resonance (NMR) による構造同定

HPLC で分画した各画分の NMR 構造解析は、崇城大学薬学部の池田剛先生に依頼した。NMR スペクトルの測定は、JEOL ECA 500NMR 分光計を使用して測定を行った。¹H および ¹³C NMR の測定は、ピリジン-*d*₅ 溶液を用いた。内部標準として ¹H NMR (7.20 ppm) および ¹³C NMR (123.5 ppm) 用のピリジン-*d*₅ を使用して、化学シフトを百万分率 (ppm) で、*J* 値を Hz で記録した。

2-8. 統計分析

得られたデータは、平均 \pm 標準偏差 (SD) として表記した (Fig. 3, 6, 7)。ボンフェローニ検定による一元配置分散分析を使用して、CMA および CML に対する阻害効果を統計的有意性について調べた。統計分析は Easy R (EZR) を使用した [35]。

3. 実験結果

3-1. 植物抽出物による AGEs 生成阻害作用

14種の植物抽出物を用いてCMAおよびCMLの生成阻害作用を有する天然物のスクリーニングを行った結果、*Byblis aquatica*、*Byblis gigantea*および*D. rotundifolia*において、濃度依存的にCMAおよびCMLの生成阻害が認められた(Fig. 2)。これらの抽出物は既知のAGEs阻害化合物であるAGよりも高い阻害率を示した。

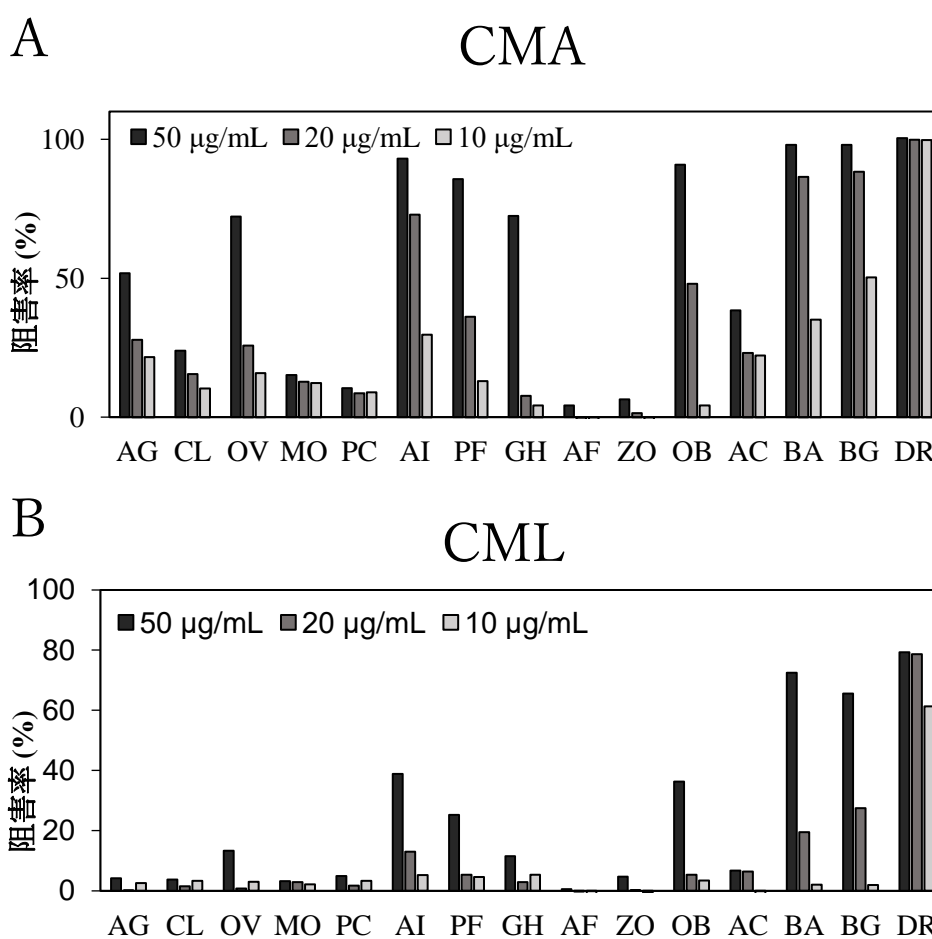


Fig. 2. AGEs 生成に対する植物抽出物の阻害作用：CMA (A) および CML (B) に対する各植物抽出物の阻害率。阻害率は、成分を添加していないコントロールと比較し、算出した。既知の AGEs 生成阻害化合物であるアミノグアニジン (AG) は阻害作用のコントロールとして用いた。n=1 (CL, レモン; OV, オレガノ; MO, モリンガ; PC, パセリ; AI, ヨモギ; PF, アカシソ; GH, カキドオシ; AF, ヒュウガトウキ; ZO, ショウガ; OB, バジル; AC, タマネギ; BA, ビブリスアクアティカ; BG, ビブリスギガンティア; DR, モウセンゴケ; AG, アミノグアニジン)。

3-2. *Drosera* 属 4 種による AGEs 生成阻害作用比較

最も高い AGEs 阻害作用を示した *D. rotundifolia* に着目し、日本で自生している *Drosera* 属 4 種 (*D. rotundifolia* : DR、*D. tokaiensis* : DT、*D. spatulata* : DS、*D. peltata* : DP) 間の CMA および CML の生成阻害作用の検討を行った。その結果、特に DR、DT および DS は DP に比べ高い阻害率を示した (Fig. 3)。

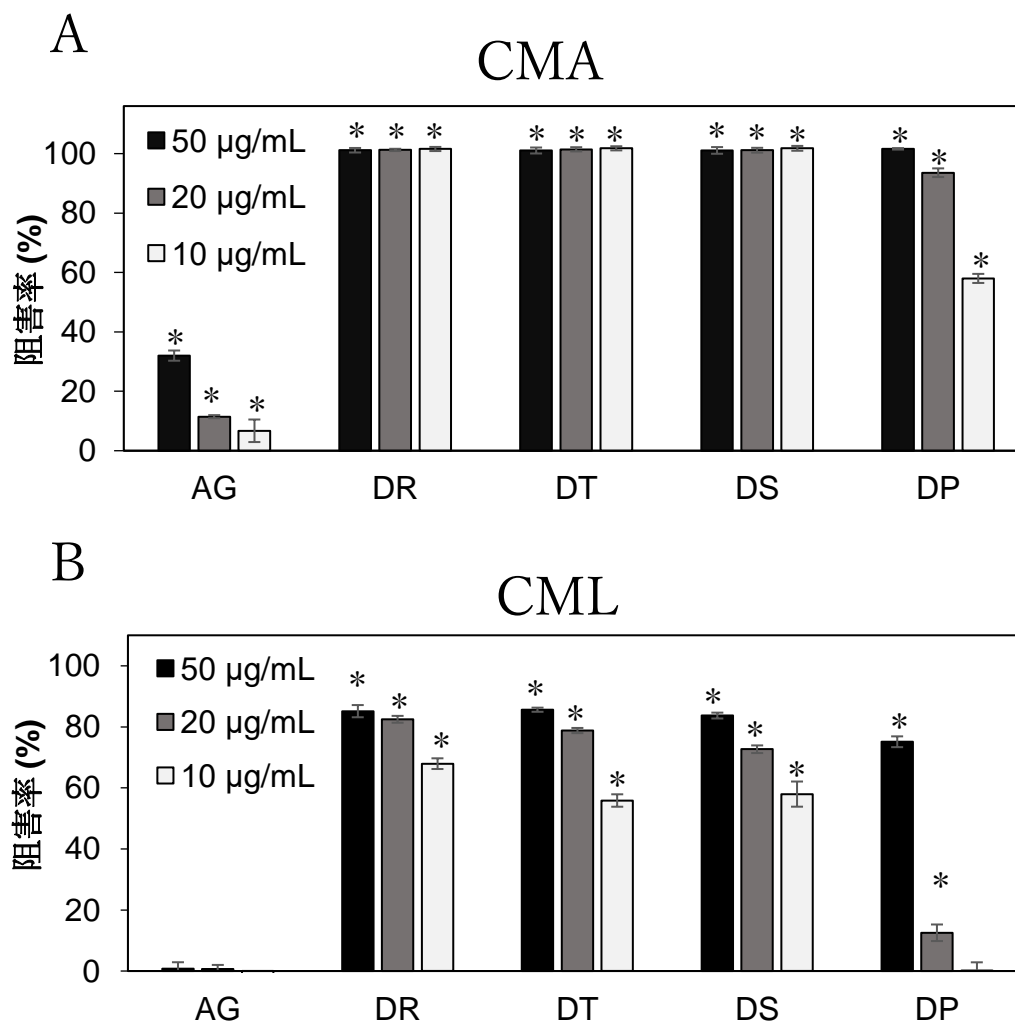


Fig. 3. AGEs 生成に対する *Drosera* 属植物抽出物の阻害作用 : CMA (A) および CML (B) に対する各 *Drosera* 属植物抽出物の阻害率。阻害率は、成分を添加していないコントロールと比較し、算出した。アミノグアニジン (AG) は、既知の AGEs 阻害剤として用いた。

D. rotundifolia : DR、*D. tokaiensis* : DT、*D. spatulata* : DS、*D. peltata* : DP; AG, アミノグアニジン。* P < 0.01 vs. コントロール。

3-3. *D. tokaiensis* 抽出物における活性画分の探索

これまでの結果より、最も高い AGEs 生成阻害作用が認められた *Drosera* 属抽出物の中でも、*D. tokaiensis* は特に高い抗炎症効果が報告されていることから [14]、*D. tokaiensis* に含まれる AGEs 生成阻害成分を同定するために Diaion HP-20 による分画を行った。*D. tokaiensis* 由来抽出物は、0~100% MeOH およびアセトンを用いて Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーによって分画し、溶出順に 6 つの画分を回収した。これらの画分における CMA および CML 生成に対する阻害作用を ELISA によって評価した。その結果、すべての画分において濃度依存的な CMA の生成阻害が認められ、特に 50% MeOH 画分は、低濃度条件 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) においても高い阻害率 (56.0%) を示した (Fig. 4A)。CML 生成に対する Diaion HP-20 画分 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の阻害作用は、50% 画分で最も高値を示し (85.4%)、次いで 20%, 70% 画分でそれぞれ 60.0%、62.2% の阻害率を示した (Fig. 4B)。

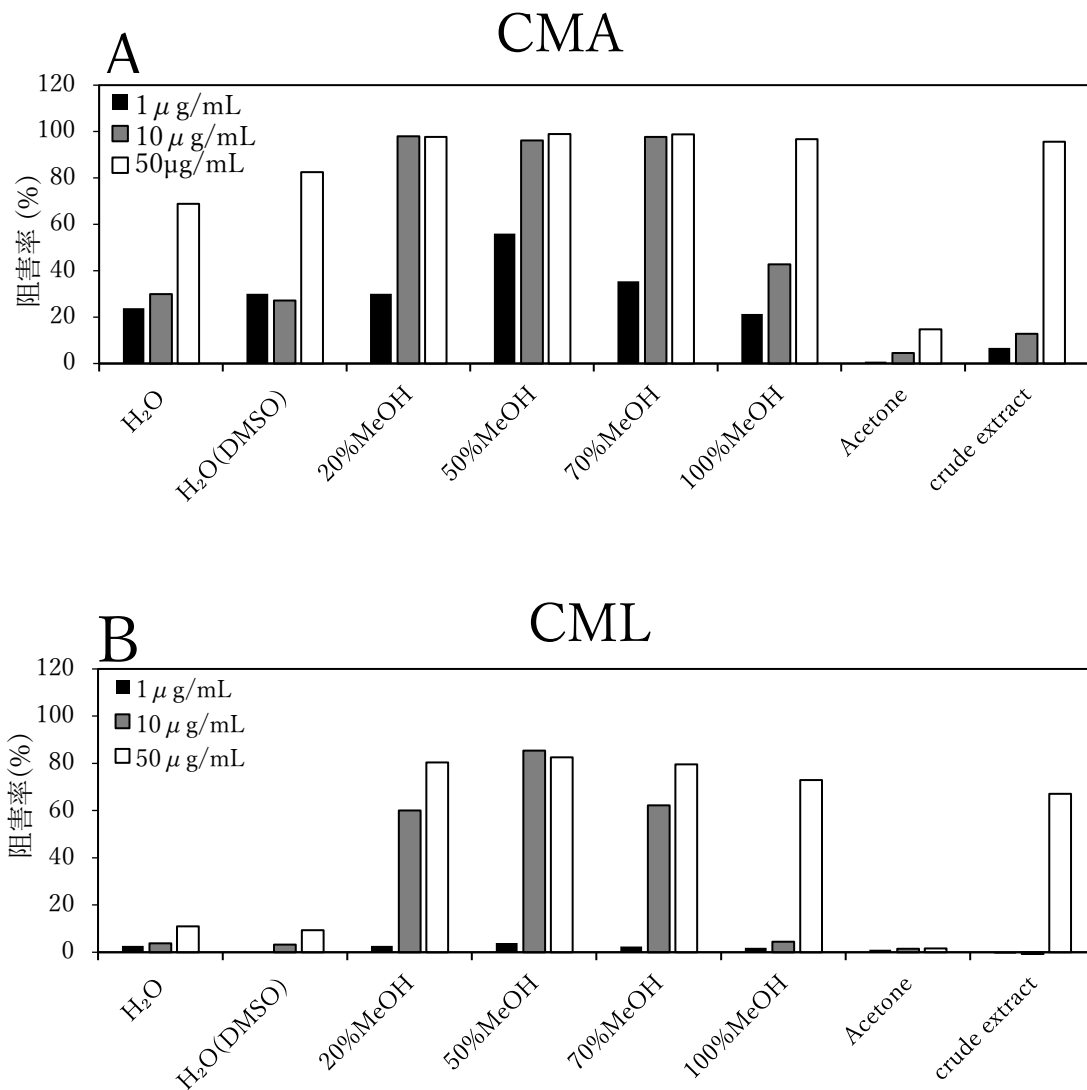


Fig. 4. *D. tokaiensis* 抽出物より分離した画分の AGEs 生成阻害作用：CMA (A) および CML (B) に対する *D. tokaiensis* 抽出物より Diaion HP-20 によって得られた画分の阻害率を示す。阻害率は、成分を添加していないコントロールと比較し、算出した。(n=1)

3-4. *D. tokaiensis* 抽出物に含まれる AGEs 生成阻害成分の単離

3-3 にて行った検討の結果、50% MeOH 画分において最も高い AGEs 生成阻害作用が認められたことから、50% MeOH 画分を HPLC にて分析したところ、7つピークが検出された (Fig. 5A)。これらピークを分取した (Table. 1)、NMR による構造解析を崇城大学にて行った。その結果、ellagic acid (2)、myricitrin (3)、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside (5) および quercitrin (7) 4 つの成分が同定された (Fig. 5、Table. 2)。また、同定されなかった成分については 6 番目の成分を除きすべての成分がフラボノイド配糖体である可能性が示唆された (Supplementary figure. 1)。

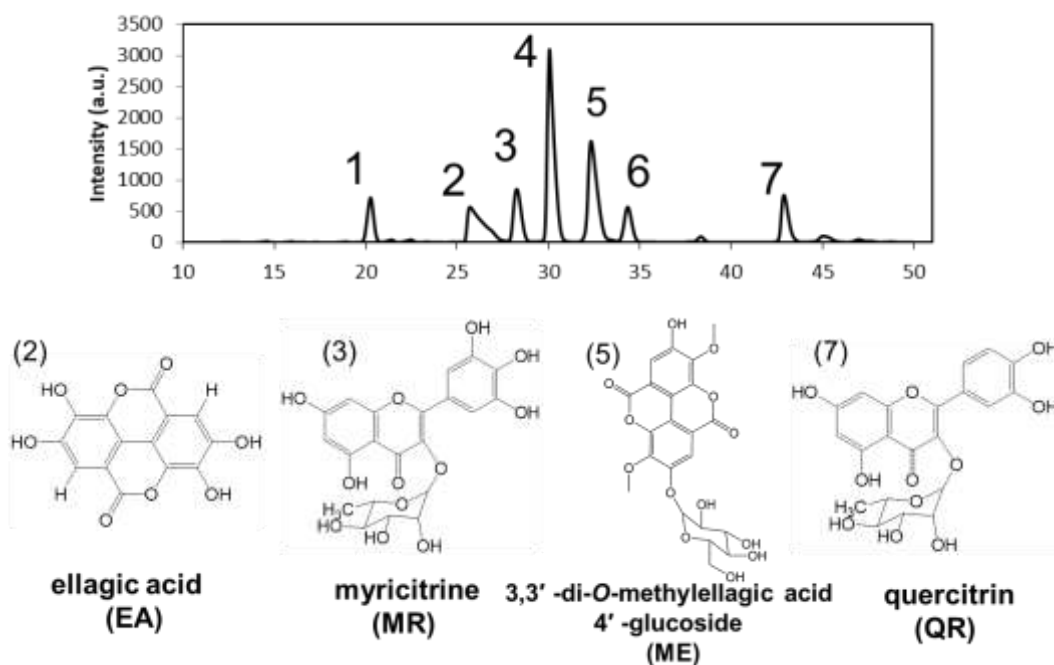


Fig. 5. *D. tokaiensis* 抽出物の 50% MeOH 画分において検出されたピークと同定された構造：(A) : DiaionHP-20 で分画した 50% MeOH 画分における HPLC の検出ピーク。(B) : NMR によって同定された成分。7つのピークのうち、2, 3, 5, 7 が同定された。(2) ellagic acid、(3) myricitrin、(5) 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside、(7) quercitrin。

Table 1. 各成分の収量 (200 回分取時)

	1	2	3	4	5	6	7
収量 (mg)	4.0	5.3	6.8	22.9	9.3	5.7	5.0

Table. ^2H および ^{13}C NMR 化学シフト

Compounds	^1H NMR (in pyridine- d_5)	^{13}C NMR (125 MHz, Pyridine- d_5)
ellagic acid	δ_{H} : 8.11 (2H, s, H-1, 1')	δ_{C} 110.3 (C-1, 1'), 149.0 (C-2, 2'), 141.7 (C-3, 3'), 136.4 (C-4, 4'), 106.7 (C-5, 5'), 112.7 (C-6, 6'), 160.1 (C-7, 7')
myricitrine	δ_{H} : 7.64 (2H, s, H-2', 6'), 6.68 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-8), 6.60 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-6), 6.01 (1H, br s, Rha H-1), 5.04 (1H, br s, Rha H-2), 4.67 (1H, dd, $J = 2.9, 9.2$ Hz, Rha H-3), 4.48 (1H, m, Rha H-5), 4.25 (1H, dd, $J = 9.2, 9.7$ Hz, Rha H-4), 1.38 (3H, d, $J = 6, 3$ Hz, Rha H-6)	δ_{C} 157.7 (C-2), 135.8 (C-3), 178.2 (C-4), 161.7 (C-5), 98.3 (C-6), 164.7 (C-7), 93.9 (C-8), 156.8 (C-9), 104.5 (C-10), 120.6 (C-1'), 108.8 (C-2', 6'), 146.7 (C-3', 5'), 138.0 (C-4'), 103.5 (Rha C-1), 71.3 (Rha C-2), 71.5 (Rha C-3), 72.4 (Rha C-4), 71.1 (Rha C-5), 17.6 (Rha C-6)
3,3'-di- <i>O</i> -methylellagic acid 4'- <i>O</i> -glucoside	δ_{H} : 8.34 (1H, s, H-1), 8.07 (1H, s, H-1'), 5.78 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, Glc H-1), 4.50 (1H, dd, $J = 2.0, 9.7$ Hz, Glc H-6), 4.36 (1H, d, $J = 9.2, 8.0$ Hz, Glc H-3), 4.35 (1H, d, $J = 6.9, 9.2$ Hz, Glc H-2), 4.29 (1H, m, Glc H-6'), 4.27 (1H, dd, $J = 8.6, 8.0$ Hz, Glc H-4), 4.26 (3H, s, 3- <i>O</i> -CH ₃), 4.21 (3H, s, 3'- <i>O</i> -CH ₃), 4.12 (1H, m, Glc H-5)	δ_{C} 113.0 (C-1), 151.9 (C-2), 142.2 (C-3), 141.6 (C-4), 112.3 (C-5), 114.2 (C-6), 158.7 (C-7), 112.5 (C-1'), 153.6 (C-2'), 141.0 (C-3'), 140.7 (C-4'), 112.1 (C-5'), 111.1 (C-6'), 158.7 (C-7'), 102.1 (Glc C-1), 74.0 (Glc C-2), 77.4 (Glc C-3), 70.3 (Glc C-4), 78.2 (Glc C-5), 61.5 (Glc C-6)
quercitrin	δ_{H} : 7.97 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-2'), 7.57 (1H, dd, $J = 2.3, 8.0$ Hz, H-6'), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8), 6.66 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-6), 6.08 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, Rha H-1), 5.03 (1H, br s, Rha H-2), 4.60 (1H, dd, $J = 2.9, 9.2$ Hz, Rha H-3), 4.28 (1H, dq, $J = 9.2, 6.3$ Hz, Rha H-5), 4.25 (1H, dd, $J = 9.2, 9.7$ Hz, Rha H-4), 1.36 (3H, d, $J = 6, 3$ Hz, Rha H-6)	δ_{C} 157.5 (C-2), 135.8 (C-3), 178.3 (C-4), 161.8 (C-5), 99.0 (C-6), 164.9 (C-7), 93.9 (C-8), 156.9 (C-9), 104.7 (C-10), 121.6 (C-1'), 116.4 (C-2'), 146.2 (C-3'), 148.4 (C-4'), 115.8 (C-5'), 121.5 (C-6'), 103.4 (Rha C-1), 71.4 (Rha C-2), 71.6 (Rha C-3), 72.4 (Rha C-4), 71.2 (Rha C-5), 17.6 (Rha C-6)

3-5. *D. tokaiensis* 抽出物より同定された成分の AGEs 生成阻害作用の検証

3-4 において *D. tokaiensis* 抽出物より同定された各成分の CMA、CML に対する生成阻害作用を明らかにするため、ELISA を用いた検証を行った。その結果、各成分は CMA 生成に対して濃度依存的な阻害作用を示し (Fig. 6A)、CML 生成に対しては 100 μ M 添加条件において、ellagic acid, myricitrin, 3,3'-di-*O*-methylelagic acid 4'-*O*-glucoside および quercitrin は、それぞれ 59.5% \pm 0.276、62.8% \pm 4.448、14.5% \pm 3.659、および 26.3% \pm 3.29 の阻害率を示した (Fig. 6B)。

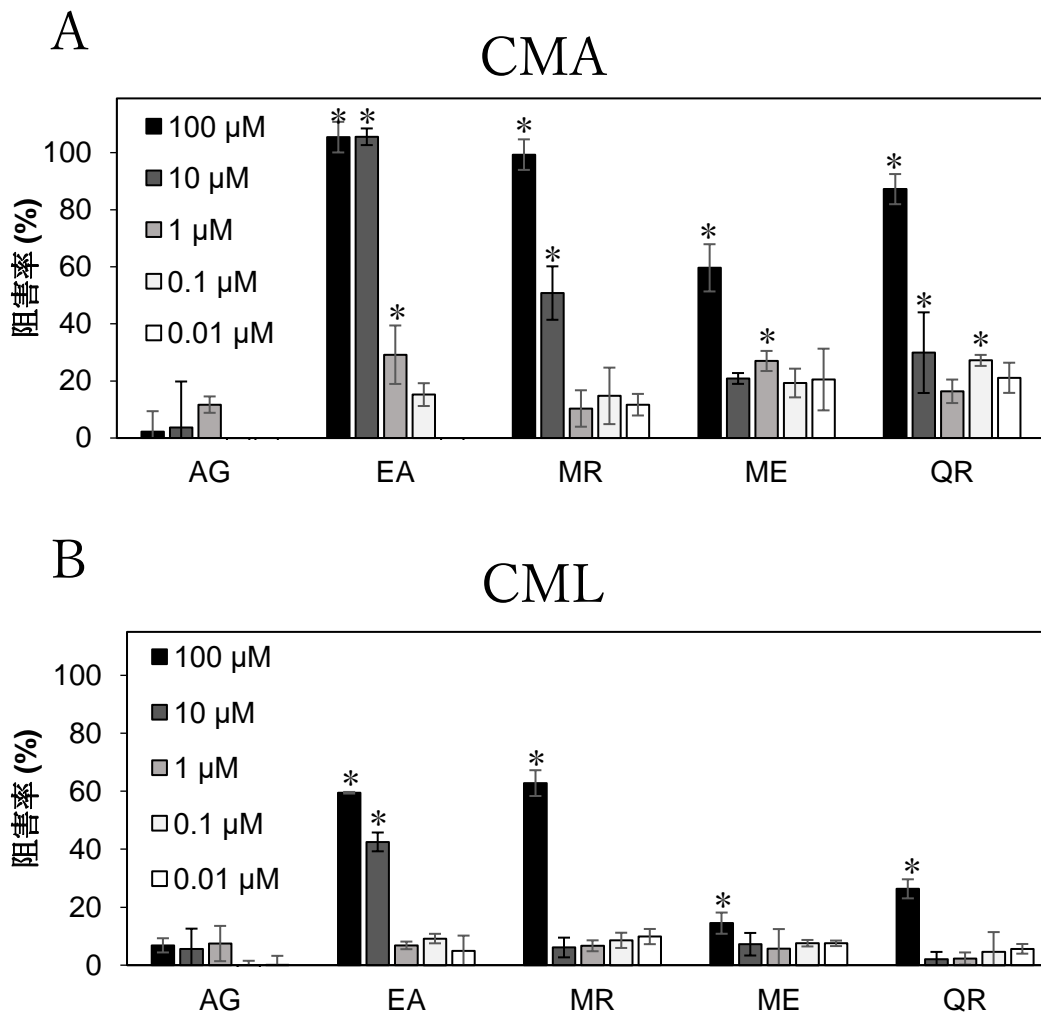


Fig. 6. *D. tokaiensis* 抽出物より同定された成分の AGEs 生成阻害作用 : D.
D. tokaiensis 抽出物より同定された成分の CMA (A) および CML (B) に対する阻害率を示す。阻害率は、成分を添加していないコントロールと比較し、算出した。アミノグアニジン (AG) は既知の AGEs 生成阻害剤として用いた。ellagic acid: MR、myricitrin: MR、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside: ME、quercitrin: QR。データは平均±SD (n=3) として表記。* P<0.01vs.コントロール。

3-6. *D. tokaiensis* 抽出物より同定された成分の GO 由来 AGEs 生成阻害効果の評価

D. tokaiensis から単離された各成分の AGEs 生成阻害効果の作用機序を検討するために GO から生成される CMA 生成に対する阻害作用を測定した。その結果、100 μ M の添加濃度では、ellagic acid、myricitrin、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside および quercitrin は、それぞれ $7.4 \pm 4.84\%$ 、 $15.8 \pm 10.29\%$ 、 $10.2 \pm 3.22\%$ 、 $9.8 \pm 4.66\%$ の阻害率を示し、アミノグアニジン (AG) の阻害率 ($46.4 \pm 1.60\%$) に比べ、低値であった (Fig. 7)。

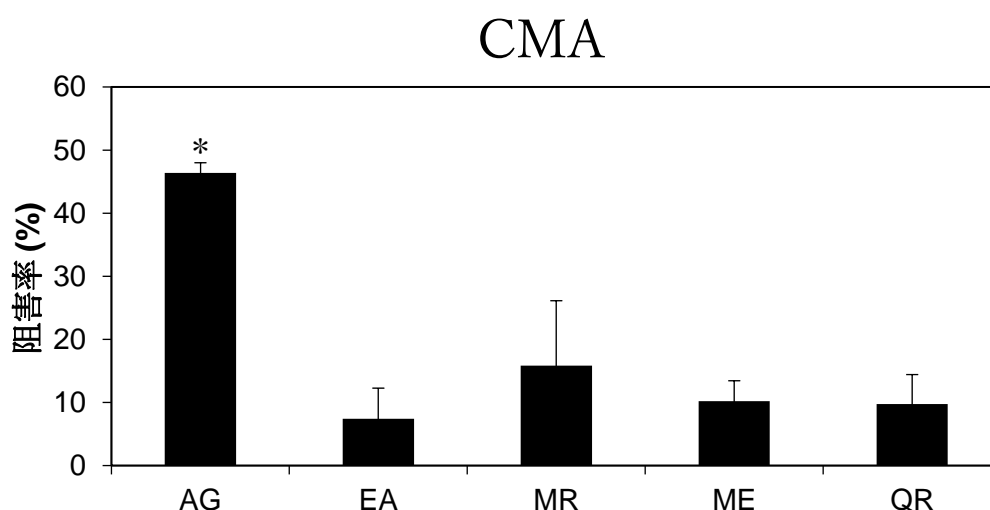


Fig. 7. *D. tokaiensis* 抽出物より同定された成分の GO 由来 AGEs 生成阻害効果評価のための CMA 検出: *D. tokaiensis* 抽出物より同定された成分の CMA に対する阻害率。阻害率は、成分を添加していないコントロールと比較し、算出した。アミノグアニジン (AG) は既知の AGEs 生成阻害剤として用いた。ellagic acid: MR、myricitrin: MR、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside: ME、quercitrin: QR。データは平均 \pm SD (n=3) として表記。* P<0.01vs.コントロール。

4. 考察

Kinoshita *et al.* らは、以前 AGEs 形成を阻害するいくつかの植物由来成分の摂取が、生活習慣病の予防のための有望な戦略である可能性があることを提案した [9]。AG は、AGE 阻害剤として報告された最初の合成化合物である [36]。AG は糖尿病性腎症患者および糖尿病ラットの網膜症の発症を予防するが [37, 38]、マウス組織におけるピリドキサーリン酸の減少や糖尿病性腎症患者の自己免疫疾患の発症などの副作用も報告されている [38, 39]。したがって、AGE 形成に対する阻害効果が AG よりも優れている植物由来成分の探索に焦点を当てた。本研究では、*D. rotundifolia* が 1 次スクリーニングで用いた植物由来抽出物の中で最も活性が高かったことから、*Drosera* 属抽出物の AGE 形成阻害効果に着目した (Fig.2)。本属に分類される *D. rotundifolia* は、抗炎症作用があり、気管支炎の伝統的な薬として使用されており、ellagic acid や quercetin などの複数の抗酸化成分を含んでいる [11]。続いて、日本にも分布する *Drosera* 属 (*D. rotundifolia*, *D. tokaiensis*, *D. spatulata*, *D. peltata*) の CMA および CML の形成に対する阻害効果を評価した。その結果から明らかなように、すべての抽出物は、AG よりも効果的に CMA および CML の形成を阻害した (Fig.3)。しかしながら、*D. rotundifolia* はヨーロッパでは絶滅危惧種に指定されている [40]。そこで、*D. tokaiensis* に着目し、AGE 形成阻害寄与する活性成分を同定した。これにより、ellagic acid、myricitrin、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside および quercitrin の 4 つの成分が初めて同定された。*D. tokaiensis* に含まれる成分の中で最も効果的に AGEs 生成を阻害した ellagic acid は、Raghu *et al.* (2016) らによって糖尿病ラットの腎臓における CML の蓄積を阻害し、糖尿病性腎症を改善することが報告されている [41]。また、Ding *et al.* (2014) らの報告では、マウス内皮機能障害やアテローム性動脈硬化を改善することを示している [42]。さらに、いくつかの研究では、エラグ酸が腸内細菌叢によってウロリチンに代謝されることが報告されており [43, 44]、ウロリチンも抗糖化能を有することが報告されている [45] ことから、ellagic acid は、動物やヒトが摂取した際、生体内において腸内でウロリチンに代謝された後に吸収され AGEs 生成を阻害する可能性が示された。

一方で、3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside は ellagic acid と類似した構造であったが、本研究において高い AGEs 生成阻害作用は認められなかった。3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside のようなメチル基を有する構造は、メチル基が無い構造と比較して抗糖化作用が低下することが報告されていることから [46]、本成分における AGEs 阻害効果の低下は、メチル基による活性の低下によるものだと考えられる。

また、myricitrin は AG よりも高い AGEs 生成阻害作用を示したが、Hayder *et*

al. (2007) らの報告では myricitrin は抗酸化能を有しているため [47] メイラード反応の後期反応における酸化反応を阻害する可能性が示された。対照的に、quercitrin は、いくつかの研究において、抗糖化能が報告されている [48, 49] にも関わらず、本研究ではそれほど高い AGEs 生成阻害作用を示さなかった。この理由として、測定対象とした AGEs の構造の違いによる可能性が考えられる。先行研究では、蛍光性 AGEs の生成阻害効果の評価を行っているが、本研究では、CMA および CML の生成阻害作用の検討を行っている。よって、quercitrin は、蛍光性 AGE の生成を阻害すると考えられるが、CMA および CML に対する生成阻害作用は低いことが示された。

また、AGEs は、糖の自己酸化から生成されるジカルボニル化合物である GO からも生成される [50]。そこで、生成阻害経路の探索として行った GO 由来 AGEs 生成阻害効果の評価を行った [8]。カルボニル基をトラップする AG が CMA の生成を阻害したのに対して、同定された成分では、CMA の生成阻害が認められなかったことから、同定された成分は、メイラード反応の後期反応の 1 つである酸化反応を阻害することによって CMA、CML の生成を阻害している可能性が高いと考えられた (Fig.8)。

本研究における実験はすべて *in vitro* であるため、今後は、生体における動向を調査する必要がある。しかしながら、ellagic acid は、ザクロを始めとする食品にも豊富に含まれており、糖尿病ラットへの投与実験によって、糖尿病によって生成・蓄積が促進する CML の阻害や腎臓病の症状改善等が報告されている [41]。また、ザクロに含まれる ellagic acid は、品種にも左右されるがジュース 1 L あたり 10~40 mg 含まれていることが報告されている [51]。本研究において *D. tokaiensis* 中に含まれる ellagic acid 含量は、2 章におけるフェノール類の定量で培養条件にも左右されるがおおよそ 25~40 mg とザクロと同程度であることが明らかとなっている。加えて、今回同定することができなかった 3 成分の内 2 成分は、フラボノイド配糖体であることが示唆されていることから、今回同定されなかった成分以外にも CMA、CML 生成阻害効果を有する成分が複数含まれている可能性がある。以上のことから、*D. tokaiensis* の摂取は AGEs の生成・蓄積を減少させ、生活習慣病の予防につながると考えられる。

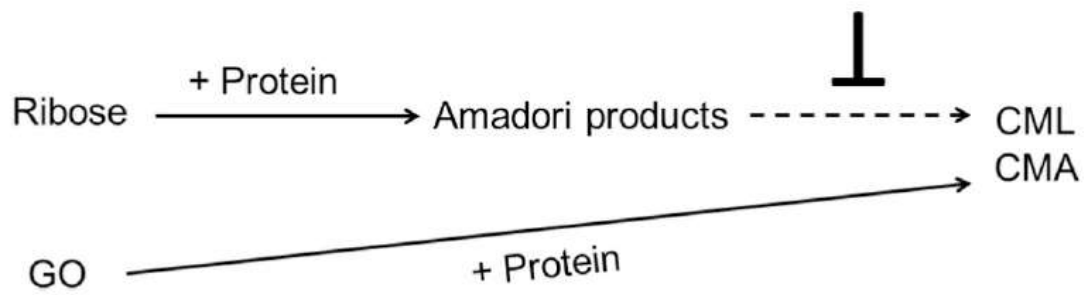


Fig. 8. *D. tokaiensis* 由来成分による CMA および CML 生成阻害メカニズム：点線は酸化依存経路を示す。*D. tokaiensis* に含まれる 4 種のフェノール類は、メイラード反応の後期反応における酸化反応を阻害するによって CMA および CML の生成を阻害した。

5. 小括

抗酸化や抗炎症能が報告されている植物より、AGEs 生成阻害成分の探索を行った結果、*Drosera* 属の植物に高い活性が認められた。特に高い抗炎症能が報告され、AGEs 生成阻害作用が高かった *D. tokaiensis* において、AGEs 生成阻害成分の単離を行い、4種のフェノール類が AGEs 生成阻害に関与していることが明らかとなった。

第2章

1. 背景

植物組織培養は、光波長、温度、培地組成を制御した条件下で生育させることができるため、植物二次代謝産物の持続的生産に利用されている [15, 16]。特に、植物培養に用いる光の波長は、光合成にとって重要な因子であり、成長速度や成分含量に影響を与える。したがって、植物培養で使用する光の波長を変化させることで、培養期間を短縮し、機能性を向上させることができる可能性がある [15, 17]。植物組織培養の光源としては、白色蛍光灯が一般的に使用されているが、発光ダイオード (LED) は、耐久性、低温発光面、波長選択性など、白色蛍光灯よりも優れているため、培養用として普及している。一方で、植物の代謝物は光波長により変化するため、青色 (450~500 nm) と赤色 (610~760 nm) の光波長は、様々な植物の二次代謝物生産を向上させるために使用されることがある [18, 19]。

蛍光灯下で培養した半強度ムラシゲ-スクーグ (1/2MS) 培地上での *D. tokaiensis* の組織培養が報告されているが [52]、二次代謝産物の組成や機能性が光波長によってどのような影響を受けるかは十分に検討されていない。本研究では、*D. tokaiensis* 植物組織培養に用いる光の波長に着目し、LED 光条件が *D. tokaiensis* 組織培養におけるフェノール類含量に影響を与えるかを評価した。また、CMA および CML の生成に対する阻害効果について評価した。

2. 実験方法

2-1. 使用した植物

Drosera tokaiensis (Accession: JpnHa6x-9) の種子を静岡県で採集された。植物種は形態学および細胞学的に同定された。種子を 0.1% 亜塩素酸ベンザルコニウム溶液で 5 分間、さらに 0.6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 5 分間表面殺菌し、その後、種子を滅菌水で 3 回洗浄し、3.0% のスクロースと 0.2% のジェランガムを添加した半強度ムラシゲ・スクーグ (1/2MS) 培地 [53] で無菌的に発芽させた *D. tokaiensis* 植物体は、東海大学農学部の植物環境科学研究で維持された。

2-2. LED を用いた *D. tokaiensis* の組織培養条件

D. tokaiensis は、2.5% のショ糖と 0.2% のジェランガムを添加した 1/2MS 培地 [52] で維持・継代培養した (オートクレーブ滅菌前の pH は 5.7)。植物体は、栽培室内で $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) 蛍光灯または LED 光を 24 時間照射し、20°C で培養し、60 日間隔で継代培養した。LED 光条件には、単色光として赤、緑、青、混色光として赤/緑 (1:1)、赤/青 (1:1)、緑/青 (1:1)、白色 LED を用いた。培養した植物は生重量を測定し、凍結乾燥機にて乾燥させた後に乾燥重量を測定した。

2-3. *D. tokaiensis* の抽出方法

D. tokaiensis の地上部組織 6~5 g (乾燥重量) を秤量し、150 mL の 80% MeOH 中、室温 (20°C) で 3 日間抽出した後、抽出物を濾過し、エバポレーターで濃縮し、凍結乾燥して粉末状の粗抽出物を得た。これらの抽出物を用いて、ELISA 法を用いて CMA および CML の形成阻害作用を評価した。

2-4. *D. tokaiensis* 粗抽出物の調整

乾燥した粗抽出物を水で希釈した後、Sep-Pac C18 カラム (Supelco, PA, USA) に吸着させ、100% MeOH で溶出した。溶出した画分をエバポレーターを用いて減圧下で濃縮した。

2-5. HPLC を用いたエキス中機能性成分の定量分析

精製した抽出液を HPLC (島津製作所、京都：システムコントローラー CBM-20A、ポンプ LC-20AD、UV 検出器 SPD-20A、オートサンプラー SIL-20A、カラムオーブン CTO-20AC) を用いて *D. tokaiensis* 機能性成分の定量分析を行った。*D. tokaiensis* 由来抽出物 20 μ L をコスモシル充填カラム 5C18-AR-II (4.6 \times 250mm；ナカライテスク株式会社、京都、日本) に注入した。カラム温度は 40 $^{\circ}$ C に保った。移動相は、溶媒 A として 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) (富士フイルム和光純薬株式会社)、溶媒 B として 60% アセトニトリル (CAN) 0.1% TFA を用いた。溶離液は 365 nm の UV 分光光度計でモニターし、ellagic acid (EA), myricitrin (MR), quercitrin (QR) を測定した。

2-6. ELISA を用いた *D. tokaiensis* の CML および CMA 形成阻害作用の評価

0.2 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いて、それぞれ 60 mM リボースおよび 4 mg/ml ゼラチンとなるように調製し混合させた。混合させたりボースゼラチン溶液に、天然物抽出物 (1~10 μ g/mL) または AG (10~100 μ M) となるように添加し、37 $^{\circ}$ C で 7 日間インキュベートした。以降の ELISA 法は、1 章の 2-4-2. と同様に行った。結果は得られた吸光度をもとに、以下の式で阻害率として算出した：

$$100 - \left[\frac{\text{サンプル-ブランク}}{\text{コントロール-ブランク}} \times 100 \right].$$

ブランク：天然物未添加かつインキュベートしていないリボースゼラチン溶液

コントロール：天然物未添加インキュベートしたリボースゼラチン溶液

2-7. 統計分析

データは平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表した。CMA および CML に対する阻害効果は、一元配置分散分析 (ANOVA) とチューキー・クレーマー検定を用いて評価した。統計解析は EZR ソフトウェア [35] を用いて行った。

3. 実験結果

3-1. *D. tokaiensis* 組織培養における単色 LED 光の影響

LED 単色光が植物組織培養に及ぼす影響を調べるため、*D. tokaiensis* を赤、緑、青の光で培養した。各単色光条件下での培養植物の外見の変化、生重量および乾燥重量を測定し、分析した。その結果、LED 単色光条件下では、赤色光条件下で植物体の色が濃くなり、緑、青条件の順で植物体の色が薄くなることが明らかとなった。また、生重量については青色光が最も高く(9.59 ± 0.74 g) 赤色光ではほかの群と比較して有意に低い生重量(7.42 ± 0.91 g)を示した。乾燥重量(0.66 ± 0.03~0.69 ± 0.04 g)は、各単色光条件間で有意差は認めらず、蛍光灯培養(1.06 ± 0.06 g)において有意に高値を示した。(Fig. 9E)。

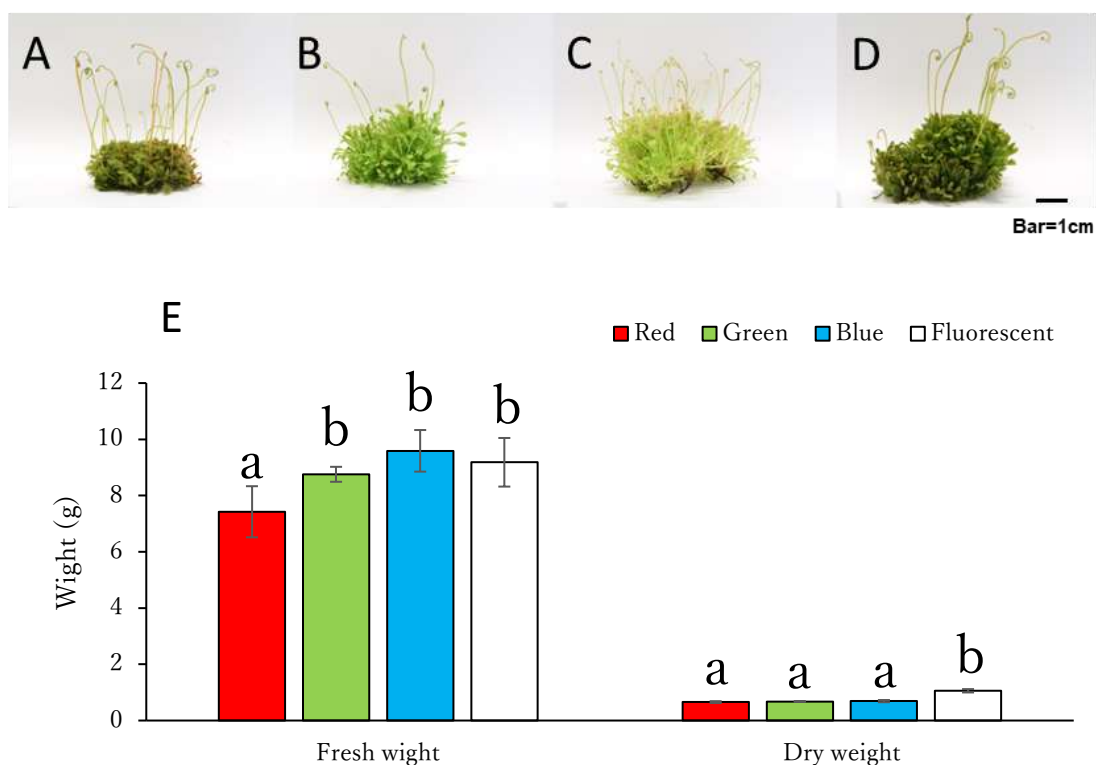


図 9. 単色 LED 光で培養した *D. tokaiensis* の外観と生重量の蛍光灯と比較した変化: (A) 赤色、(B) 青色、(C) 緑色 LED または (D) 蛍光灯の光条件下で培養した植物体の外観と重量の変化。各光条件下で 1 g の植物体を 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD で 2 か月間培養した。バーは 1 cm。(E) 培養期間終了時の各植物の生重量の平均 \pm SD 値 (n=5)。異なる文字は、各実験条件における $p < 0.05$ での有意差を示す。

3-2. 単色 LED 光条件下で生育した *D. tokaiensis* におけるフェノール類含量の変化

異なる光条件下で生育させた *D. tokaiensis* のフェノール類含量の変化を、HPLC を用いて比較した。その結果、すべての光条件下で 7 つの明確なピークが観察された (Fig. 10A)。次に、構造が同定され、AGEs を阻害することが報告されている EA、MR、QR に注目した [51]。LED または蛍光灯下で培養した植物中のこれらの成分の含量を計算した (Fig. 10B、Supplementary figure. 1 および Supplementary Table. 1)。単色 LED 光照射下で培養した植物の EA 含量は、蛍光灯培養に比べて約 12.01~9.16 μg と有意に増加した。赤色 LED 光照射下で培養した植物の EA 含量は $35.86 \pm 3.29 \mu\text{g}$ と LED 光照射条件の中で最も高かったが、これは青色および緑色光照射条件と有意な差はなかった。一方、白色蛍光灯下培養における EA 含量は、LED 条件よりも有意に低かった ($23.85 \pm 0.04 \text{ g}$)。一方で、MR、QR は、白色蛍光灯培養 (MR: $1.95 \pm 0.14 \text{ g}$, QR: $0.52 \pm 0.03 \text{ g}$) よりも有意に含量が減少することが明らかとなった。

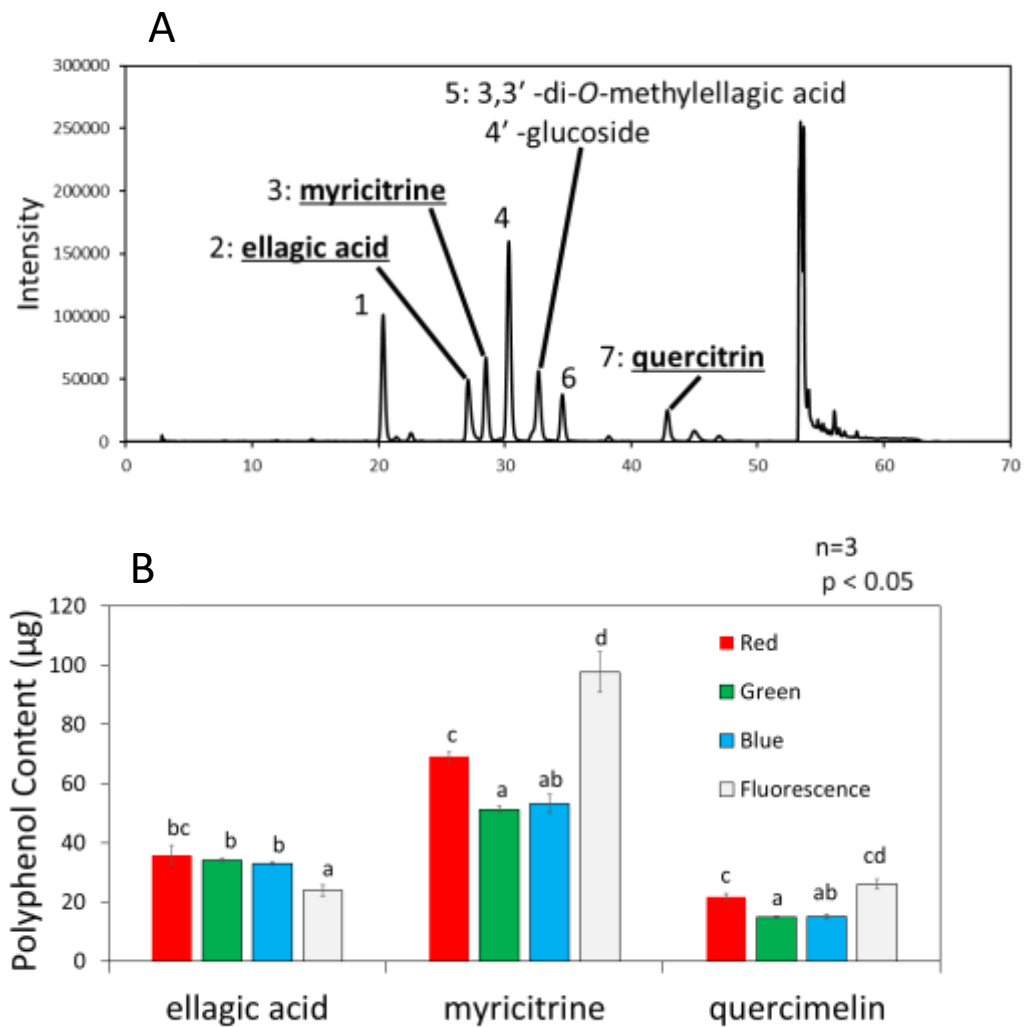


Fig. 10. 単色 LED 光で生育させた *D. tokaiensis* のフェノール類含量の比較: 各植物から抽出物を得た後、HPLC を用いて同定・分析した。(A)蛍光灯で培養した *D. tokaiensis* 由来抽出物に含まれる 7 種のフェノール性類。(B) 分離した画分中の EA (2)、MR (3) および QR (7) 含量の定量値。各分析は 3 連で行い、平均値±SD で示した。*p < 0.05. EA: ellagic acid、MR: myricitrin、QR: quercitrin。

3-3. 単色 LED 光条件下で培養した *D. tokaiensis* 由来抽出物の AGEs 阻害効果

AGE 形成阻害活性は、既述のように抽出物の乾燥重量あたりの阻害効果を測定することで評価した [51]。試験した LED 光条件下で生育させた植物培養物から得られたすべての試料は、AG (10 $\mu\text{g/ml}$: $15.0 \pm 5.26\%$, 5 $\mu\text{g/ml}$: $5.26 \pm 7.33\%$) と比較して、AGEs 生成を有意に阻害した (Fig. 11A および B)。CML 生成阻害率に関しては、赤色単色 LED 光条件下での阻害率 ($74 \pm 8.00\%$) が白色蛍光灯と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。しかしながら、緑、青の単色光では白色蛍光灯条件下との差は認められなかった。同様に、CMA 生成阻害率に関しては、赤色単色 LED 光条件下で培養した植物からの抽出物によって最も阻害された (赤色光で $94 \pm 1.28\%$)。しかし、LED 培養抽出物と蛍光灯培養抽出物の阻害率に有意差はなかった。

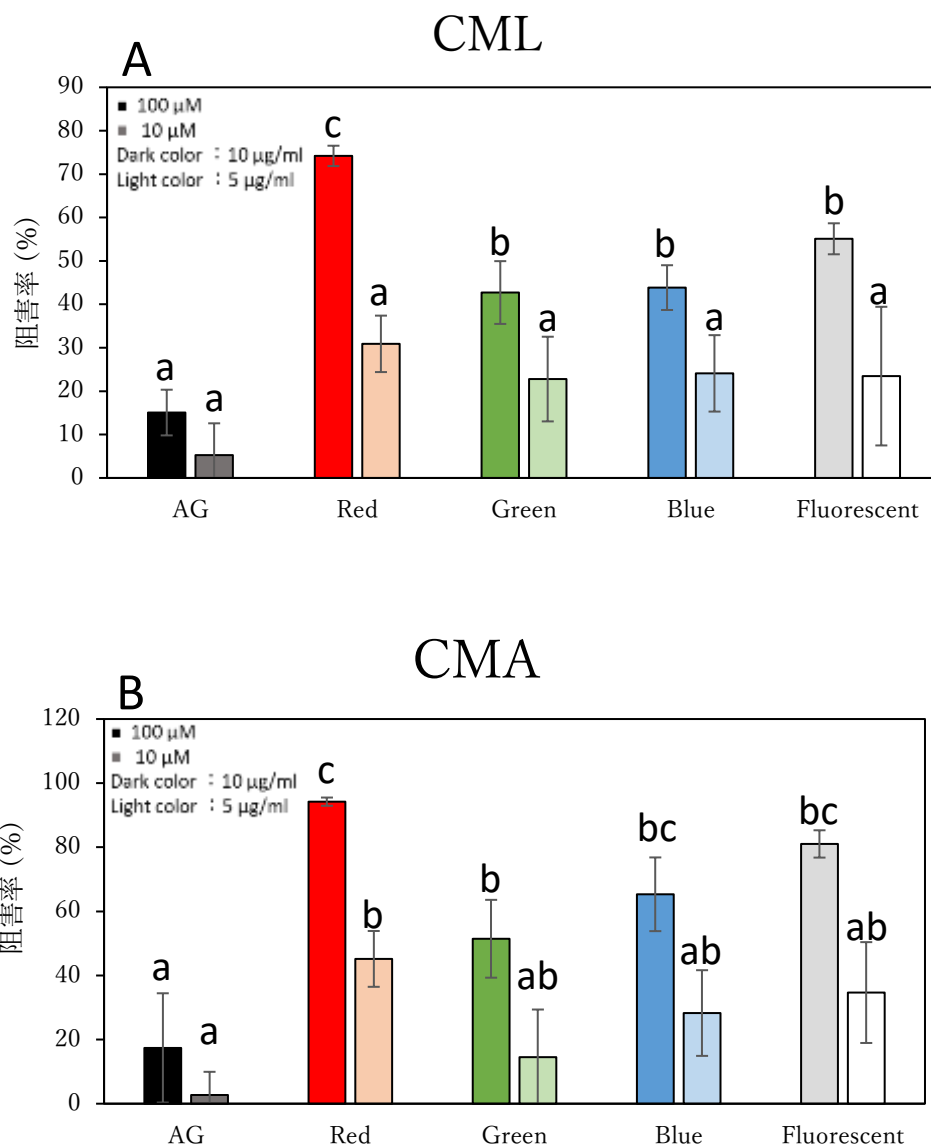


Fig. 11. 単色 LED 光で培養した *D. tokaiensis* から単離した抽出物による AGEs 生成阻害効果: 単色 LED 光条件下で培養した植物から得た抽出物による(A) CML、(B) CMA 形成阻害効果。リボース-ゼラチン溶液を、モノクローナル CMA 抗体または CML 抗体および ELISA を用いて、各抽出物 10 μg/mL または 5 μg/mL の存在下で 7 日間インキュベートした。抗原濃度は 10 μg/mL (CMA) および 1 μg/mL (CML) とした。データはコントロール (試料無添加) と比較した阻害率 (%) で表した。ゼラチンおよびリボース単独を無添加対照として用いた。各結果は、平均値±SD (n=3) で示した。異なる文字は $p < 0.05$ の有意差を示す。AG: アミノグアニジン。

3-4. *D. tokaiensis* 組織培養の成長に及ぼす複合色 LED 光条件の影響

次に、複合色 LED 光条件が *D. tokaiensis* 植物培養の成長に影響を与えるかを検討した。緑色/青色 LED 光条件下では、緑色/青色 LED 光条件下と比較して、植物体が他の条件と比較して肥大化し、赤色/青色 LED 光条件下での培養は、植物体の色が濃くなる変化が観察された。しかし、植物の生重量 (赤/緑: 8.33 ± 0.47 ~ 緑/青: 9.09 ± 0.58 g) および乾燥重 (0.64 ± 0.02 ~ 0.68 ± 0.02 g) には、これらのグループ間で有意な差は認められなかった (Fig. 12E)。

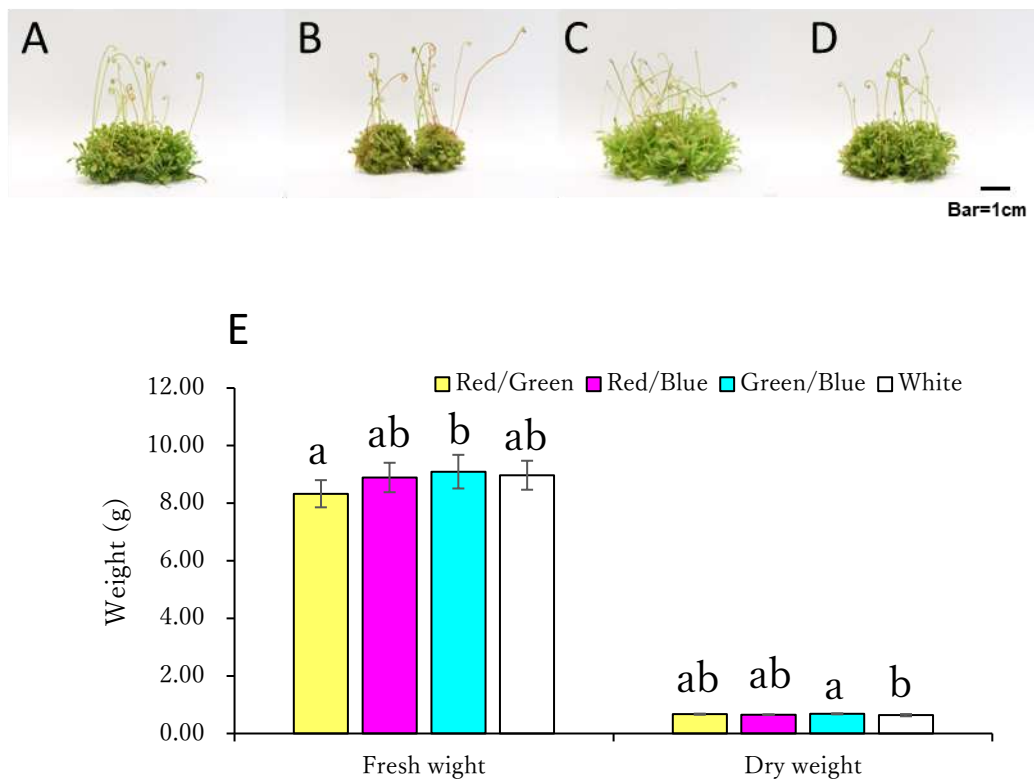


Fig. 12. 複合色 LED 光条件下で培養した *Drosera tokaiensis* の外観と新鮮重量の変化: (A) 赤/緑、(B) 赤/青、(C) 青/緑、(D) 白色 LED 混合光で培養した植物の写真。植物の外観の変化は、 $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD で各光条件下の基 1 g から 2 か月間培養した植物体の写真。(E) 培養期間終了時の各植物の生重量の平均 \pm SD (n=5)。

3-5. 複合色 LED 光条件下で培養した *D. tokaiensis* のフェノール類含量の変化

EA の含量は単色光の条件と同様に蛍光灯培養と比較してどの群でも優位に増加することが明らかとなった ($p < 0.05$) (Fig. 13)。特に白色 LED の条件下では EA の含量が最も高値を示した ($43.3 \pm 2.31 \mu\text{g}$)。

一方で、MR および QR 含量は、赤/緑もしくは緑/青の条件下で蛍光灯培養よりも有意に減少する ($p < 0.05$) ことが明らかとなった。しかしながら QR においては赤/青もしくは白色 LED 条件下で蛍光灯培養と同等の含量 (26.63 ± 3.48 , 24.3 ± 1.66) を示すことが明らかとなった (Fig. 13、Supplementary figure. 2 および Table. 1)。

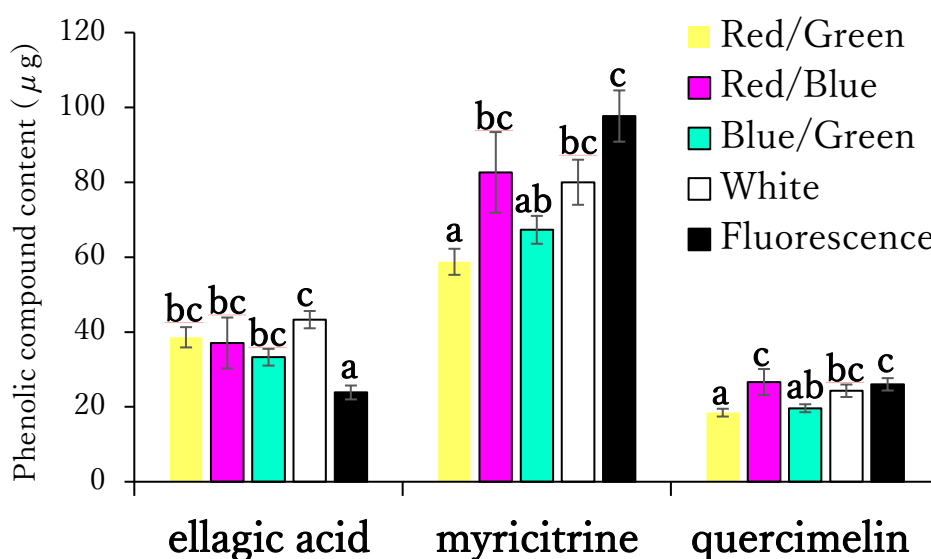


Fig. 13. 複合色 LED 光条件下で生育させた *D. tokaiensis* の分離株におけるフェノール類含量の比較: 異なる LED 光条件下で生育させた *D. tokaiensis* 植物から抽出物を得た後、HPLC を用いて分析した。単離した抽出物中の EA、MR、QR 含量を定量値として表した。各分析は 3 回行い、平均値 \pm SD で示した。異なる文字は、各実験条件において $p < 0.05$ で有意差があることを示す。EA : ellagic acid、MR : myricitrin、QR : quercitrin。

3-6. 複合色 LED 光条件下で生育した *D. tokaiensis* の AGEs 形成阻害効果の変化

複合色 LED 光条件が *D. tokaiensis* 抽出物の機能性に影響を及ぼすかを調べるため、複合 LED 光で培養した *D. tokaiensis* 植物から単離した抽出物による CML および CMA 形成阻害を ELISA を用いて測定した。成分添加濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ では、AG と比較して有意な抑制効果は認められたものの各培養条件間での CML および CMA 生成阻害効果に有意な差は認められなかった。添加濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の *D. tokaiensis* 抽出物は、培養条件に関わらず、AG ($3.88 \pm 11.05\%$) と比較して有意な阻害効果を示した ($p < 0.05$)。赤色 LED、赤色/緑色 LED、赤色/青色 LED、白色 LED の条件下で培養した培養物から分離した抽出物で処理した場合、CML 形成の阻害率はそれぞれ $66.8 \pm 5.70\%$ 、 $52.1 \pm 4.30\%$ 、 $57.3 \pm 2.81\%$ 、 $52.5 \pm 5.45\%$ であったが、これらの光条件間の差は統計的に有意ではなかった。緑色/青色光条件下での抽出物は 46.8% の阻害を示し、これは赤色光条件下で生育させた植物から単離した抽出物よりも有意に少なかった。一方、CMA 形成阻害作用は、試験した培養光条件間で有意差はなかった (Fig. 14B)。しかし、CMA に対する抽出物の阻害作用は、LED 光条件下で生育させた植物から抽出した抽出物を蛍光灯下で生育させた植物から抽出したものと比較すると、CML 形成阻害作用よりも強かった (蛍光灯下培養では $86.7 \pm 8.12\%$ AG では $11.3 \pm 1.18\%$ であったのに対し、赤色 LED、赤/緑色 LED、赤/青色 LED、青/緑色 LED、白色 LED では、それぞれ $95.0 \pm 0.86\%$ 、 $89.6 \pm 1.09\%$ 、 $92.7 \pm 2.35\%$ 、 $84.4 \pm 8.30\%$ 、 $90.0 \pm 3.47\%$ であった) (Fig. 14B)。これらの結果から、LED と蛍光灯の培養条件は、AGEs 形成阻害に同程度の効果があることが示された。

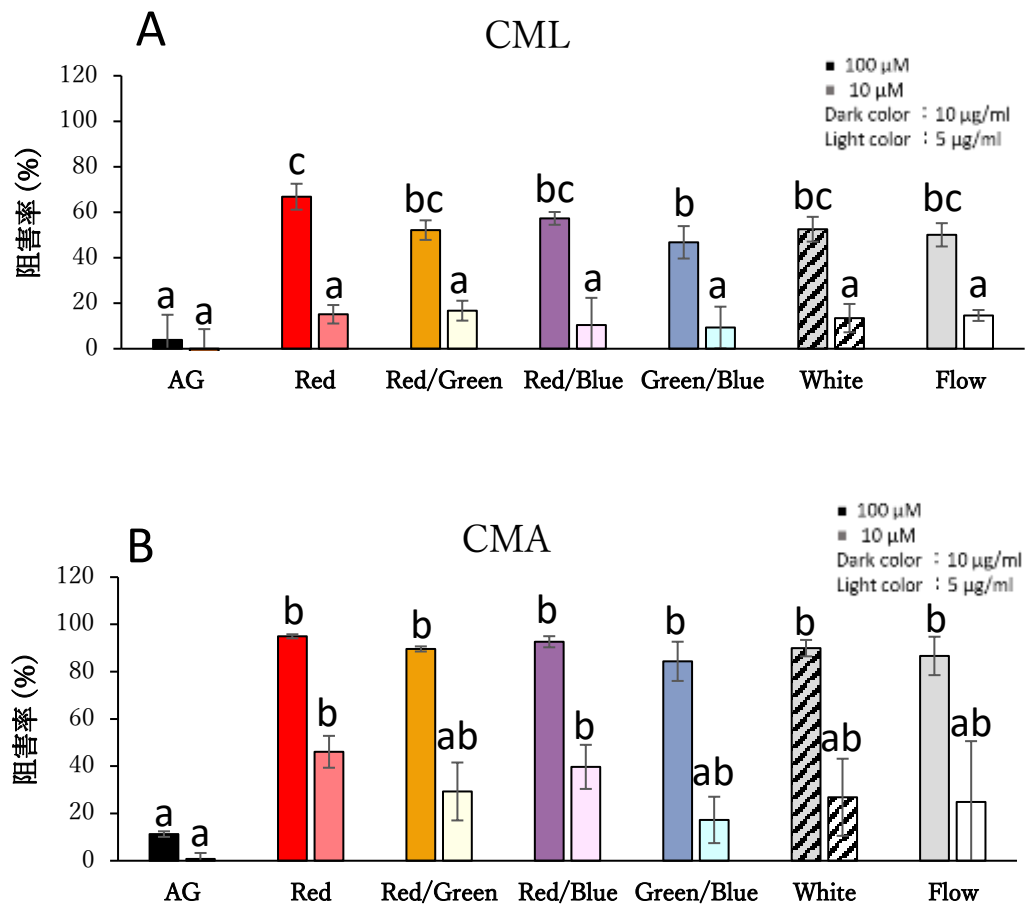


Fig. 14. 複合色 LED 光条件下で培養した *D. tokaiensis* から単離した抽出物による AGEs 形成阻害作用: 各 LED 光条件下で培養した植物由来抽出物による AGEs 形成阻害を ELISA を用いて測定した。リボースゼラチン溶液を、10 μg/mL または 5 μg/mL の各天然物抽出物の存在下で 7 日間インキュベートした。モノクローナル抗体(A) CML または (B) CMA (n=3) を用いて、AGEs 形成の阻害を調べた。抗原濃度は 10 μg/mL (CMA) と 1 μg/mL (CML)。データはコントロール (試料無添加) と比較した阻害率 (%) で表した。ゼラチンおよびリボース単独を無添加対照として用いた。各実験は n=3 で行い、平均値±SD で示した。異なる文字は、各実験条件内で p<0.05 の有意差を示す。AG: アミノグアニジン。

4. 考察

Drosera 属の無菌培養は、成長率と二次代謝産物の生産性の制御を可能にし、法的に保護された種を商業的に利用する唯一の方法である [54]。本研究では、光波長が *D. tokaiensis* の組織培養における成長と二次代謝産物産生にどのように影響するかに焦点を当てた。赤色 LED 条件では他の条件と比べて生重量が有意に低かったが、乾燥重量には差はなかった。この結果から、赤色 LED 光で生育した植物は、赤色光以外で生育した植物よりも水分量が少ないことが示された。植物には、赤色光を受容するフィトクロムや青色光を受容するフォトトロピン、クリプトクロムなどの光受容体が備わっており、光の強さや明暗周期などの光環境を認識する。特に、フィトクロムは植物の伸長に関与しており、赤色光を受容することで植物の伸長を抑制することが報告されている [53]。以上のことから、赤色光による *D. tokaiensis* の水分含量の減少はフィトクロムが活性化したためであると考えられる。一方で、水分含量の増加が認められた緑および青色光では、植物は光合成に不利な光環境を避けるため、茎を伸ばしてよりよい光環境に脱出しようとする避陰反応が誘導された可能性が考えられた。

植物における二次代謝産物の役割は完全には解明されていないが、生物学的害虫防除のように、植物自体に有益な効果をもたらす可能性がある [54]。これまでの報告からいくつかの植物では、フラボノイド合成に関与する酵素が光曝露によって変動することが知られている [55]。また、植物で生産されるフェノール類は、フェニルアラニンとチロシンを基質として様々な酵素によって生合成される [56]。本研究において、Fig10、Fig13 に示すように、光条件は EA、MR、QR などのフェノール性類の含有量を大幅に変化させた。したがって、LED による光波長調節は、EA の生合成に関与する *D. tokaiensis* 組織培養中の酵素を活性化し、MR や QR などのフラボノイドの生合成に関与する酵素を抑制すると推察された。本成果は、*Drosera* 属植物を有効的に活用する上で、重要な知見である。

AGEs 形成の阻害は、生活習慣病予防のための有望な戦略である可能性がある [9, 57, 58]。そこで、AGEs 形成を効果的に阻害する新規成分を様々な植物から探索したところ、*D. tokaiensis* 由来抽出物は AG よりも AGEs 形成を効果的に阻害し、これらの抽出物中の EA がこの阻害に重要な役割を果たしている可能性を見出した [52]。本研究の結果は、蛍光灯で成長させたものと比較して、赤色 LED 光で成長させた *D. tokaiensis* 由来抽出物による CML 形成の有意な阻害効果を示したことから、特に酸化ストレス条件における AGEs 生成に効果がある事が予測された (Fig.11A)。これは、LED 培養が EA の生産を促進し、MR および QR 含有量が LED 培養グループの中でも赤色光で最も高かったことによるものだと推察された (Fig.10, 13)。EA は *D. tokaiensis* 抽出物の AGEs 形成の主要

な阻害剤と考えられるが、複合 LED 光条件で培養した *D. tokaiensis* から分離された抽出物間で CMA 形成の阻害に有意差は観察されなかった。しかしながら、単色光中で培養した *D. tokaiensis* から分離した抽出物の CML 形成阻害効果は、複合光条件下における抽出物よりも大きかった。この結果は、緑色/青色光培養物よりも赤色光培養物から分離された抽出物中の EA および他のフェノール類の含有量が高いことに起因する可能性が考えられた。

また、本研究では、粗抽出物を用いた実験も行い、ellagic acid は全 LED 条件で増加し、MR および QR 含有量は特に緑色および青色 LED と比較して赤色 LED で増加することが明らかとなった。しかしながら、LED は蛍光灯条件下で培養した植物体と比較して乾燥重量を有意に減少させる。したがって、本実験における単色・複合色 LED と蛍光灯条件下で培養した植物の乾燥重量における EA、MR、QR の総含量を算出した (Fig.15)。LED と蛍光灯の培養物では乾燥重量に有意差があるにもかかわらず (Fig.9、Fig.12E)、本研究で得られた乾燥重量中に含まれる EA 含量に有意差はなかった。これらの結果から、本研究で評価した LED を用いた培養法は、植物体の水分含量を高く保ちつつ *D. tokaiensis* の抗糖化活性の主要成分である EA を安定的に蓄積できると結論付けた。

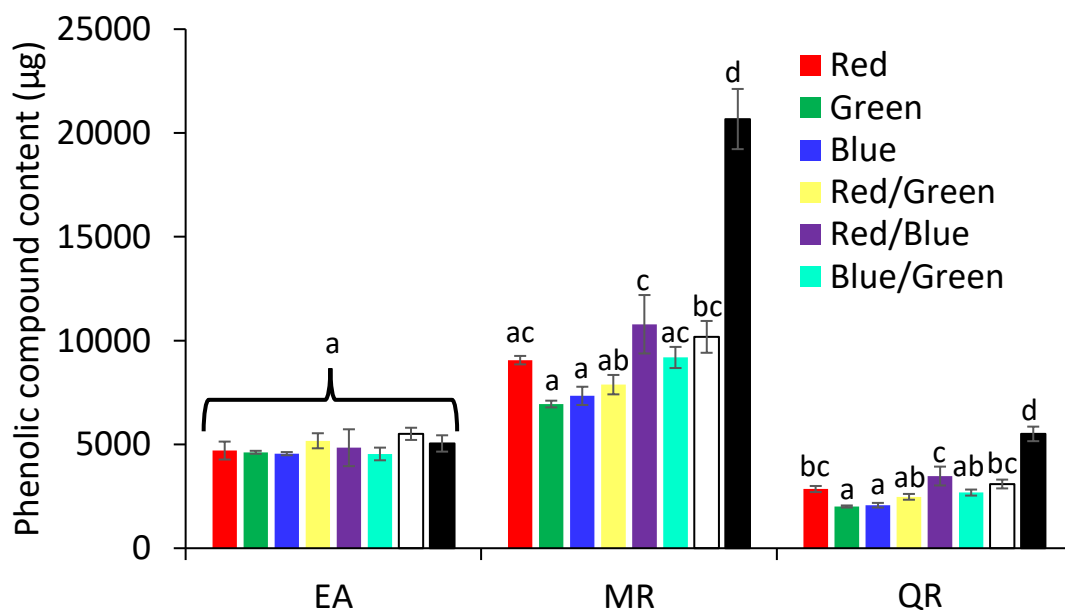


Fig. 15. 植物体内のフェノール類含有量: *D. tokaiensis* 由来抽出物を HPLC で分析した際に得られた EA、MR、および QR の定量値を乾燥重量に基づいて補正し、本実験で得られた *D. tokaiensis* 中のフェノール性類の総量を算出した。各分析は n=3 で実施し、平均±SD として提示した。EA: ellagic acid、MR: myricitrin、QR: quercitrin

5. 小括

本研究では、蛍光灯または LED の光条件下で培養した *D. tokaiensis* 組織培養物から単離した抽出物は、AGEs 形成阻害において有意差を示さなかったが、LED の光は抽出物の ellagic acid 含量を特異的に増加させた。LED の複合光（赤色/青色または白色 LED）は、単色光条件下で枯渇した抽出物中のフェノール類を、蛍光灯培養植物と同レベルまで回復させた。LED は蛍光灯よりも費用対効果が高く、環境にも優しいため、*D. tokaiensis* 組織培養には蛍光灯の代わりに LED を使用することが推奨される。加えて、EA と比較して MR と QR の差は、光波長での変動が大きいことから、光条件をより検討することで、これらフェノール類量を増加させる条件を確立できる可能性がある。特に本研究では各波長の光強度を固定しているため、今後、光強度による影響を調査することでより AGEs 生成阻害効果の高い *D. tokaiensis* の作製が期待される。

総括

近年患者数が増加傾向にあり社会問題となっている生活習慣病は、初期段階における自覚症状がほとんど認められず重篤な合併症を発症してから気づかれるケースも少なくない。特に、2型糖尿病などでは合併症として網膜症や腎症、神経障害などの細小血管障害を発症する。これら疾患の発症、進展に伴って生体内では様々な修飾タンパクが増減する。その中でも糖とタンパク質から非酵素的に生成・蓄積される AGEs は、タンパク質の立体構造を変化させるためにタンパク質本来の機能を低下もしくは失活させる恐れがある。そのため、AGEs の生成を阻害することは、疾患の発症の予防や更なる悪化を防ぐことが期待される。

本研究では、生活習慣病の発症・進展に関与する AGEs の生成阻害について、普段の食事から摂取することが可能な天然物に着目し、1章では食歴のある植物を中心に抗糖化活性のスクリーニングを行った。その結果、様々な植物から食虫植物に分類され、ヨーロッパにおいて気管支感染症の民間療法としてシロップやドロップのような形状で用いられてきた *Drosera* 属に高い抗糖化活性があることを明らかにし、その中でも *D. tokaiensis* が高い抗糖化活性を有ることを見出した。さらに、その活性成分として ellagic acid や myricitrin を始めとする複数のフェノール類が同定され、これら成分が有する抗酸化能によってメイラード反応の後期反応や糖の自己酸化を阻害することによるものであると結論付けた。

2章では、*D. tokaiensis* の組織培養における光条件に着目し、LED 条件下で培養した際のポリフェノール含量の変化および抗糖化活性の変化を検討した。LED の波長領域によって植物の水分含量が大きく変化することが明らかとなったものの植物体の乾燥重量は大きく変動しないことを明らかにした。また、HPLC を用いた抗糖化活性成分の定量では、LED を用いることで従来の培養方法よりも高濃度に ellagic acid を蓄積することが明らかとなったがフラボノイドについては従来の培養方法よりも減少することが明らかとなった。植物を培養する際は光条件を複合することで更に効率よく培養することができる。実際に、一部の複合条件下では、減少していたフラボノイド類の含量が従来の培養方法と同程度まで回復させた。興味深いことに培養方法の変化に伴ってポリフェノール含量が変化したにも関わらず抗糖化活性については従来の培養法と比較して同等の活性を示した。以上のことから、*D. tokaiensis* の LED 培養は、従来の培養方法よりも費用対効果が高く環境にやさしいため *D. tokaiensis* 組織培養における照明には LED を用いることが推奨されることを結論付けた。本研究の組織培養において、光の条件は内在する 2 次代謝産物の生産能に影響するこ

とから今後より詳細な培養条件を検討することにより効率的な培養方法の確立が期待される。また、強力な抗糖化活性を有する *D. tokaiensis* の摂取は、**ellagic acid** を中心とする複数の2次代謝産物によって生活習慣病の発症・進展に効果的に働くことが推察される。以上のことから生活習慣病治療に対する莫大な費用の削減につながることで結果的に生活の質向上が期待される。

謝辞

本研究遂行に際し、終始ご指導、ご助言を頂きました、東海大学農学部食生命科学科の永井竜児先生をはじめ、山口浩教授、小野政輝教授、米田一成教授、木下英樹准教授に謝意を表します。また、サンプルの提供をしていただきました植物環境科学研究室星良和教授並びに食品生体調節学研究室の皆様はこの場をお借りして厚く感謝、御礼を申し上げます。

参考文献

- [1] P. Saeedi, I. Petersohn, P. Salpea, B. Malanda, S. Karuranga, N. Unwin, S. Colagiuri, L. Guariguata, A.A. Motala, K. Ogurtsova, J.E. Shaw, D. Bright, R. Williams, IDF Diabetes Atlas Committee
Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9 (th) edition *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 157 (2019), p. 107843, 10.1016/j.diabres.2019.107843
- [2] N. Torres, M. Guevara-Cruz, L.A. Velázquez-Villegas, A.R. Tovar
Nutrition and atherosclerosis *Arch. Med. Res.*, 46 (2015), pp. 408-426, 10.1016/j.arcmed.2015.05.010
- [3] B. Ramamurthy, L. Larsson
Detection of an aging-related increase in advanced glycation end products in fast- and slow-twitch skeletal muscles in the rat *Biogerontology*, 14 (2013), pp. 293-301, 10.1007/s10522-013-9430-y
- [4] V.P. Singh, A. Bali, N. Singh, A.S. Jaggi
Advanced glycation end products and diabetic complications *KOREAN J. PHYSIOL. PHARMACOL.*, 18 (2014), pp. 1-14, 10.4196/kjpp.2014.18.1.1
- [5] 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., 15 (7) (2016), pp. 2566-2573, 10.1039/c5fo01563d
- [6] E.D. Schleicher, E. Wagner, A.G. Nerlich
Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging
J. Clin. Invest., 99 (1997), pp. 457-468, 10.1172/JCI119180
- [7] N. Rabbani, P.J. Thornalley
Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease
Kidney Int., 93 (2018), pp. 803-813, 10.1016/j.kint.2017.11.034
Epub 2018 Feb 22
- [8] S. Kinoshita, K. Mera, H. Ichikawa, S. Shimasaki, M. Nagai, Y. Taga, K. Iijima, S. Hattori, Y. Fujiwara, J.I. Shirakawa, R. Nagai
N(omega)-(Carboxymethyl)arginine is one of the dominant advanced glycation end products in glycated collagens and mouse tissues

- Oxid Med Cell Longev, 10 (2019), p. 9073451, 10.1155/2019/9073451
- [9] S. Kinoshita, H. Sugawa, T. Nanri, R.I. Ohno, J.I. Shirakawa, H. Sato, N. Katsuta, S. Sakake, R. Nagai
Trapa bispinosa Roxb. and lutein ameliorate cataract in type 1 diabetic rats
J. Clin. Biochem. Nutr., 66 (2020), pp. 8-14, 10.3164/jcbrn.19-34
- [10] F. Rivadavia, K. Kondo, M. Kato, M. Hasebe
2003. Phylogeny of the sundews, *Drosera* (*Droseraceae*), based on chloroplast rbcL and nuclear 18S ribosomal DNA sequences.
Am. J. Bot. 90, 123–130. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.1.123>.
- [11] D.H. Paper, E. Karall, M. Kremser, L. Krenn
2005. Comparison of the antiinflammatory effects of *Drosera rotundifolia* and *Drosera madagascariensis* in the HET-CAM assay. Phytother Res. 19, 323–326. <https://doi.org/10.1002/ptr.1666>.
- [12] Krenn L., Langer, " R., Kopp Qualit"
atsprüfung, B., 1995. von Sonnentaukraut Deutsche Apothekerzeitung 135, 867–870.
- [13] Y. Hoshi, J. Shirakawa, M. Hasebe, K. Fukushima, K. Kondo
2008. Tandem repeat rDNA sequences derived from parents were stably maintained in hexaploids of *Drosera spathulata* complex (*Droseraceae*). Cytologia 73, 313–325. <https://doi.org/10.1508/cytologia.73.313>.
- [14] K. Fukushima, K. Nagai, Y. Hoshi, S. Masumoto, I. Mikami, Y. Takahashi, H. Oike, M. Kobori
2009. *Drosera rotundifolia* and *Drosera tokaiensis* suppress the activation of HMC-1 human mast cells. J. Ethnopharmacol. 125, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.06.009>.
- [15] I. Smetanska
2008. Production of secondary metabolites using plant cell cultures. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 111, 187–228. https://doi.org/10.1007/10_2008_103.
- [16] K. Danova, L. Pistelli
2022. Plant tissue culture and secondary metabolites production. Plants. <https://doi.org/10.3390/plants11233312>.
- [17] S. Dutta Gupta, B. Jatothu
2013. Fundamentals and applications of light-emitting diodes (LEDs) in in vitro plant growth and morphogenesis. Plant Biotechnol. Rep. 7, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0277-0>.
- [18] S. Zhang, L. Zhang, H. Zou, L. Qiu, Y. Zheng, D. Yang, Y. Wang
2021. Effects of light on secondary metabolite biosynthesis in medicinal plants. Front.

- Plant Sci. 12, 781236 <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781236>.
- [19] P. Boonsongcheep, W. Sae-Foo, K. Banpakoat, S. Channarong, S. Chitsaithan, P. Uafua, W. Putha, K. Kerdsiri, W. Putalun
2019. Artificial color light sources and precursor feeding enhance plumbagin production of the carnivorous plants *Drosera burmannii* and *Drosera indica*. J. Photochem. Photobiol., B 199, 111628. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111628>.
- [20] N. Al-Musayeib, S. Perveen, I. Fatima, M. Nasir, A. Hussain
Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis* Molecules, 16 (2011), pp. 10214-10226, [10.3390/molecules161210214](https://doi.org/10.3390/molecules161210214)
- [21] C.S. Harris, L.P. Beaulieu, M.H. Fraser, K.L. McIntyre, P.L. Owen, L.C. Martineau, A. Cuerrier, T. Johns, P.S. Haddad, S.A. Bennett, J.T. Arnason
Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity Planta Med., 77 (2011), pp. 196-204, [10.1055/s-0030-1250161](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250161)
- [22] A. Aljohi, S. Matou-Nasri, D. Liu, N. Al-Khafaji, M. Slevin, N. Ahmed
Momordica charantia extracts protect against inhibition of endothelial angiogenesis by advanced glycation endproducts in vitro Food Funct, 14 (2018), pp. 5728-5739, [10.1039/c8fo00297e](https://doi.org/10.1039/c8fo00297e)
- [23] M. Makni, R. Jemai, W. Kriaa, Y. Chtourou, H. Fetoui
Citrus limon from Tunisia: phytochemical and physicochemical properties and biological activities
BioMed Res. Int., 15 (2018), p. 6251546, [10.1155/2018/6251546](https://doi.org/10.1155/2018/6251546)
- [24] B. Kaurinovic, M. Popovic, S. Vlasisavljevic, S. Trivic
Antioxidant capacity of *Ocimum basilicum* L. and *Origanum vulgare* L. extracts
Molecules, 16 (2011), pp. 7401-7414, [10.3390/molecules16097401](https://doi.org/10.3390/molecules16097401)
- [25] E.L. Tang, J. Rajarajeswaran, S. Fung, M.S. Kanthimathi
Petroselinum crispum has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells
J. Sci. Food Agric., 95 (2015), pp. 2763-2771, [10.1002/jsfa.7078](https://doi.org/10.1002/jsfa.7078)
- [26] S. Rashid, M.A. Rather, W.A. Shah, B.A. Bhat
Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd
Food Chem., 138 (2013), pp. 693-700, [10.1016/j.foodchem.2012.10.102](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.102)
- [27] E. Saita, Y. Kishimoto, M. Tani, M. Iizuka, M. Toyozaki, N. Sugihara, K. Kondo

Antioxidant activities of *Perilla frutescens* against low-density lipoprotein oxidation in vitro and in human subjects

J. Oleo Sci., 61 (2012), pp. 113-120, 10.5650/jos.61.113

[28] S.T. Chou, T.H. Lin, H.Y. Peng, W.W. Chao

Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities

Life Sci., 231 (2019), p. 116519, 10.1016/j.lfs.2019.05.075

[29] A.H. El-Ghorab, M. Nauman, F.M. Anjum, S. Hussain, M. Nadeem

A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*)

J. Agric. Food Chem., 58 (2010), pp. 8231-8237, 10.1021/jf101202x

[30] C. Jayasinghe, N. Gotoh, T. Aoki, S. Wada

Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)

J. Agric. Food Chem., 51 (2003), pp. 4442-4449, 10.1021/jf034269o

[31] N. Marefati, N. Eftekhar, M. Kaveh, J. Boskabadi, F. Beheshti, M.H. Boskabady

The effect of *Allium cepa* extract on lung oxidant, antioxidant, and immunological biomarkers in ovalbumin-sensitized rats

Med. Princ. Pract., 27 (2018), pp. 122-128, 10.1159/000487885

[32] A.L. Al-Malki, H.A. El Rabey

The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats

BioMed Res. Int., 38 (2015), p. 13, 10.1155/2015/381040

[33] H. Matsuda, T. Morikawa, T. Ohgushi, T. Ishiwada, N. Nishida, M. Yoshikawa

Inhibitors of nitric oxide production from the flowers of *Angelica furcijuga*: structures of hyuganosides IV and V

Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 53 (2005), pp. 387-392, 10.1248/cpb.53.387

[34] T. Murasnige, F. Skoog

A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures

Physiol. Plantarum, 15 (1962), pp. 473-497

[35] Y. Kanda

Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics

Bone Marrow Transplant., 48 (2013), pp. 452-458, 10.1038/bmt.2012.244

[36] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami

Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking

Science, 232 (1986), pp. 1629-1632, 10.1126/science.3487117

- [37] H.P. Hammes, S. Martin, K. Federlin, K. Geisen, M. Brownlee
Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 15 (88) (1991), pp. 11555-11558, 10.1073/pnas.88.24.11555
- [38] W.K. Bolton, D.C. Cattran, M.E. Williams, S.G. Adler, G.B. Appel, K. Cartwright, P.G. Foiles, B.I. Freedman, P. Raskin, R.E. Ratner, B.S. Spinowitz, F.C. Whittier, J.P. Wuerth ACTION I Investigator Group, Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol.*, 24 (2004), pp. 32-40, 10.1159/000075627
- [39] T. Taguchi, M. Sugiura, Y. Hamada, I. Miwa
In vivo formation of a Schiff base of aminoguanidine with pyridoxal phosphate. *Biochem. Pharmacol.*, 15 (55) (1998), pp. 1667-1671, 10.1016/s0006-2952(98)00010-0
- [40] R. Länger, B. Kopp, Qualitätsprüfung von Sonnenkraut
1. Grundlagen für die botanische Identitätsprüfung. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 135 (1995), pp. 657-664
- [41] G. Raghu, S. Jakhotia, P. Yadagiri Reddy, P.A. Kumar
Bhanuprakash Reddy Ellagic acid inhibits non-enzymatic glycation and prevents proteinuria in diabetic rats
Food Funct., 7 (2016), pp. 1574-1583, 10.1039/C5FO01372K
- [42] *J Sci Food Agric.* 2022 Feb;102(3):1185-1192. doi: 10.1002/jsfa.11456.
Y. Ding, B. Zhang, K. Zhou, M. Chen, M. Wang, Y. Jia, Y. Song, Y. Li, A. Wen
Dietary ellagic acid improves oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis: role of Nrf2 activation
Int. J. Cardiol., 175 (2014), pp. 508-514, 10.1016/j.ijcard.2014.06.045
- [43] G. Pakulski, J. Budzianowski
Ellagic acid derivatives and naphthoquinones of *Dionaea muscipula* from in vitro cultures
Phytochemistry, 41 (1996), pp. 775-778, 10.1016/0031-9422(96)89675-0
- [44] N.P. Seeram, S.M. Henning, Y. Zhang, M. Suchard, Z. Li, D. Heber
Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours
J. Nutr., 136 (2006), pp. 2481-2485, 10.1093/jn/136.10.2481
- [45] Amor AJ, Gómez-Guerrero C, Ortega E, Sala-Vila A, Lázaro I
Ellagic Acid as a Tool to Limit the Diabetes Burden: Updated Evidence. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Dec 3;9(12):1226. doi: 10.3390/antiox9121226.

- [46] B. Cerdá, P. Periago, J.C. Espín, F.A. Tomás-Barberán
Identification of urolithin a as a metabolite produced by human colon microflora from ellagic acid and related compounds
J. Agric. Food Chem., 4 (2013), pp. 414-431, 10.2174/1389200211314040005
- [47] N. Hayder, I. Bouhleb, I. Skandrani, M. Kadri, R. Steiman, P. Guiraud, A. Mariotte, K. Ghedira, M. Dijoux-Franca, L. Chekir-Ghedira
In vitro antioxidant and antigenotoxic potentials of myricetin-3-O-galactoside and myricitrin from *Myrtus communis*: modulation of expression of genes involved in cell defence system using cDNA microarray *Toxicol. Vitro*, 22 (2008), pp. 567-581, 10.1016/j.tiv.2007.11.015
- [48] L. Ferchichi, S. Derbré, K. Mahmood, K. Touré, D. Guilet, M. Litaudon, K. Awang, A.H. Hadi, A.M. Le Ray, P. Richomme
Bioguided fractionation and isolation of natural inhibitors of advanced glycation end-products (AGEs) from *Calophyllum flavoramulum*
Phytochemistry, 78 (2012), pp. 98-106, 10.1016/j.phytochem.2012.02.006
- [49] Y.S. Kim, D.H. Jung, I.S. Lee, S.J. Choi, S.Y. Yu, S.K. Ku, M.H. Kim, J.S. Kim
Effects of *Allium victorialis* leaf extracts and its single compounds on aldose reductase, advanced glycation end products and TGF- β 1 expression in mesangial cells
BMC Compl. Alternative Med., 3 (13) (2013), p. 251, 10.1186/1472-6882-13-251
- [50] K.J. Wells-Knecht, D.V. Zyzak, J.E. Litchfield, S.R. Thorpe, J.W. Baynes
Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose
Biochemistry, 34 (1995), pp. 3702-3709, 10.1021/bi00011a027
- [51] A Tarantino, G Difonzo, G Disciglio, L Frabboni, VM Paradiso, G Gambacorta, F Caponio. **Fresh pomegranate juices from cultivars and local ecotypes grown in southeastern Italy: comparison of physicochemical properties, antioxidant activity and bioactive compounds.**
- [52] Tominaga, Y., Sugawa, H., Hirabayashi, K., Ikeda, T., Hoshi, Y., Nagai, R., 2020. ***Drosera tokaiensis* extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products.** *Arch. Biochem. Biophys.* 693, 108586 <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108586>.
- [53] Murashige, T., Skoog, F., 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** *Physiol. Plantarum* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- [54] Siatkowska, K., Chraniuk, M., Bollin, P., Banasiuk, R., 2021. **Light emitting**

diodes optimisation for secondary metabolites production by *Droseraceae* plants.

J. Photochem. Photobiol., B 224, 112308.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2021.112308>.

[55] Rao, S.R., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20, 101–153. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(02)00007-1).

[56] Watanabe, B., Nishitani, S., Koeduka, T., 2021. Synthesis of deuterium-labeled cinnamic acids: understanding the volatile benzenoid pathway in the flowers of the Japanese loquat *Eriobotrya japonica*. *J. Label. Compd. Radiopharm.*

<https://doi.org/10.1002/jlcr.3933>.

[57] R. Ohno, N. Moroishi, H. Sugawa, K. Maejima, M. Saigusa, M. Yamanaka, M. Nagai, M. Yoshimura, Y. Amakura, R. Nagai

Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity

***J. Clin. Biochem. Nutr.*, 57 (2015), pp. 27-32, [10.3164/jcfn.15-13](https://doi.org/10.3164/jcfn.15-13)**

[58] Matsuda, S., Sugawa, H., Shirakawa, J.I., Ohno, R.I., Kinoshita, S., Ichimaru, K., Arakawa, S., Nagai, M., Kabata, K., Nagai, R., 2017. *Aphanothece sacrum* (sur.) okada prevents cataractogenesis in type 1 diabetic mice. *J. Nutr. Sci.*

***Vitaminol.* 63, 263–268. <https://doi.org/10.3177/jnsv.63.263>.**

使用した器具・試薬

〈抽出〉

- ・メタノール：Methanol [和光純薬工業株式会社、139-01827、特級]
- ・アセトン：Acetone [和光純薬工業株式会社、011-00357、特級]

〈サンプル調製〉

- ・DMSO：Dimethyl Sulfoxide [和光純薬工業株式会社、043-07216]
- ・ゼラチン：Gelatin from porcine skin, Type A, [SIGMA ALDRICH、G2500]
- ・リボース：D-(-)-Ribose [東京化成工業株式会社、R0025]
- ・リン酸水素二ナトリウム・12水和物：Disodium Hydrogenphosphate 12-Water [和光純薬工業株式会社、196-02835]
- ・リン酸水素二ナトリウム二水和物：Disodium Dihydrogenphosphate Dihydrate [関東化学株式会社、37239-00]
- ・40% グリオキサール：40% Glyoxal Solution [和光純薬工業株式会社、078-00905]

〈ELISA〉

- ・ブロッキング用ゼラチン：GELATIN HYDROLYSATE [SIGMA ALDRICH、G-0262]
- ・ルテオリン：3',4',5',7',-Tetrahydroxyflavone [東京化成工業株式会社、T2682]
- ・ellagic acid：Ellagic Acid [和光純薬工業株式会社、057-08751]
- ・Tween20：Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate [和光純薬工業株式会社、167-11515]
- ・硫酸：Sulfuric Acid [和光純薬工業株式会社、195-04706]
- ・過酸化水素：H₂O₂ [関東化学株式会社、18084-00]
- ・OPD tablet：OPD・2HCl 5 mg/Tablet (α -フェニレンジアミン二塩酸塩 5 mg/錠) [和光純薬工業株式会社、158-02151]
- ・monoclonal anti-CML antibody (6D12) 2 % Sorbitol 0.1 % procrin 952 μ g/mL
- ・monoclonal anti-CMA antibody (3F5) 2 % Sorbitol 0.1 % procrin 736 μ g/mL
- ・PBS：NaCl 320 g、KCl 8 g、KH₂PO₄ 8 g、Na₂HPO₄・12H₂O 115.2 g
超純水 4L にメスアップして作製し、使用時は超純水にて 10 倍希釈した。
- ・Washing Buffer：PBS 2L に、Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate (Tween20) を 1.0 mL (PBS の 0.05 %) 添加し、攪拌した。

• Substrate buffer

- 1) Citric acid を 2.1 g 量り、100 mL の超純水に溶かす
- 2) Na₂HPO₄ · 12H₂O を 7.16 g 量り、200 mL の超純水に溶かす
- 3) 1 をビーカーに 80% 程入れておき、攪拌しながら、2 を加えて pH5.0 に調整した。

• 0.2M リン酸緩衝液 pH7.2

- 1) Na₂HPO₄ · 12H₂O を 17.9 g 測りとり、250 mL の超純水に溶解して、200 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O 溶液を 250mL 作製した。
- 2) NaH₂PO₄ · 2H₂O 7.8 g 測りとり、250 mL の超純水に溶解し、200 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O 溶液を 250 mL 作製した。
⇒1) と 2) を混ぜ、pH7.2 に調製した。

〈HPLC〉

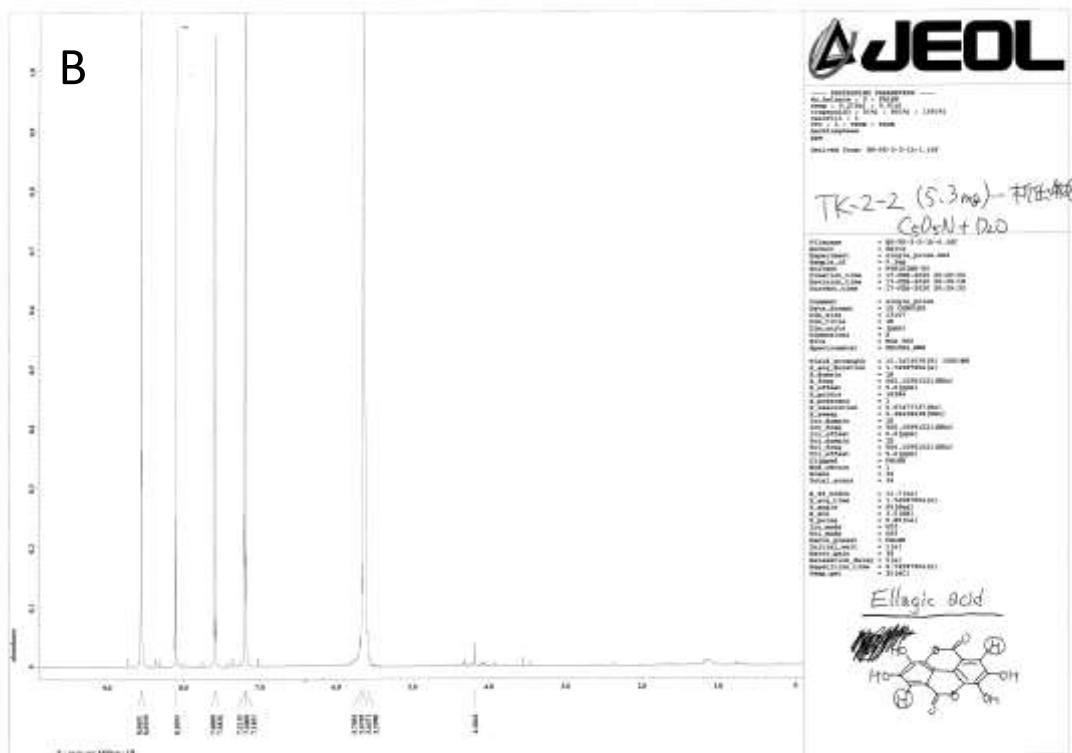
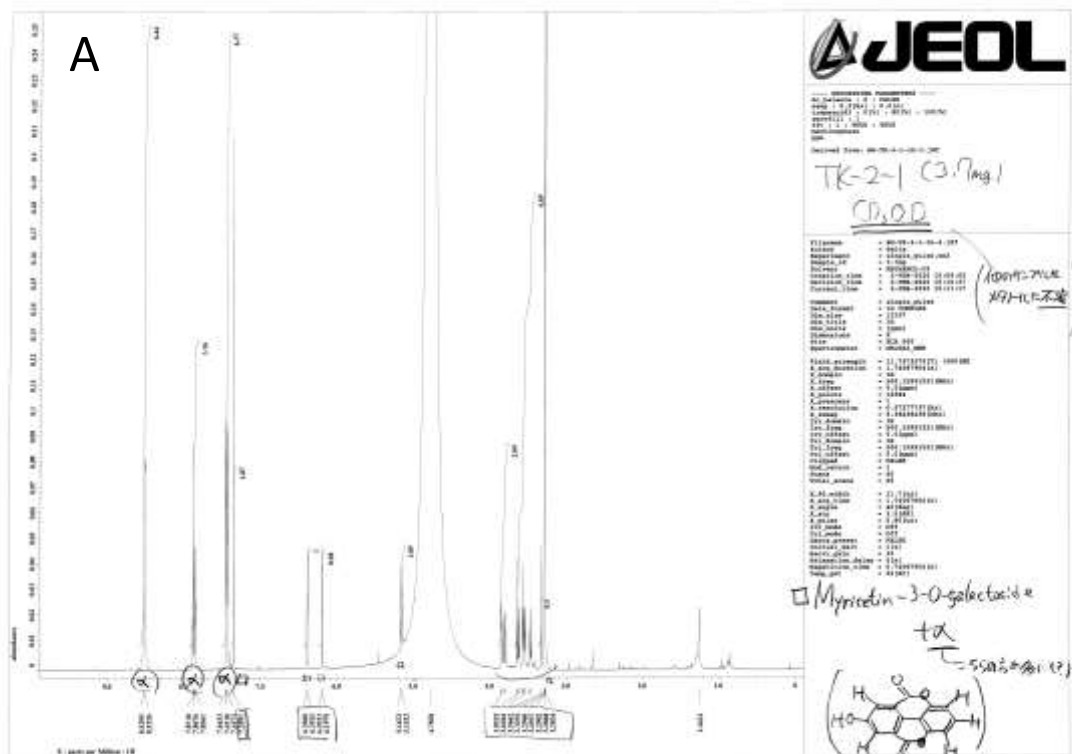
- アセトニトリル : Acetonitrile [和光純薬工業株式会社、014-00381、特級]
- 特級メタノール [和光純薬工業株式会社、137-01823、特級]
- トリフルオロ酢酸 : Trifluoroacetic Acid [和光純薬工業株式会社、208-02741]
- 溶媒 A : 超純水 / 0.1% TFA
 - 1) 脱気を行った 1L の超純水に対して 1 ml の TFA を添加、混合し超純水 / 0.1% TFA を作成した。
- 溶媒 B : 60% Acetonitrile / 0.1% TFA
 - 1) 600 ml の Acetonitrile と 400 ml の超純水を混合、脱気した。その後 1 ml の TFA を添加、混合し、60% Acetonitrile / 0.1% TFA を作成した。

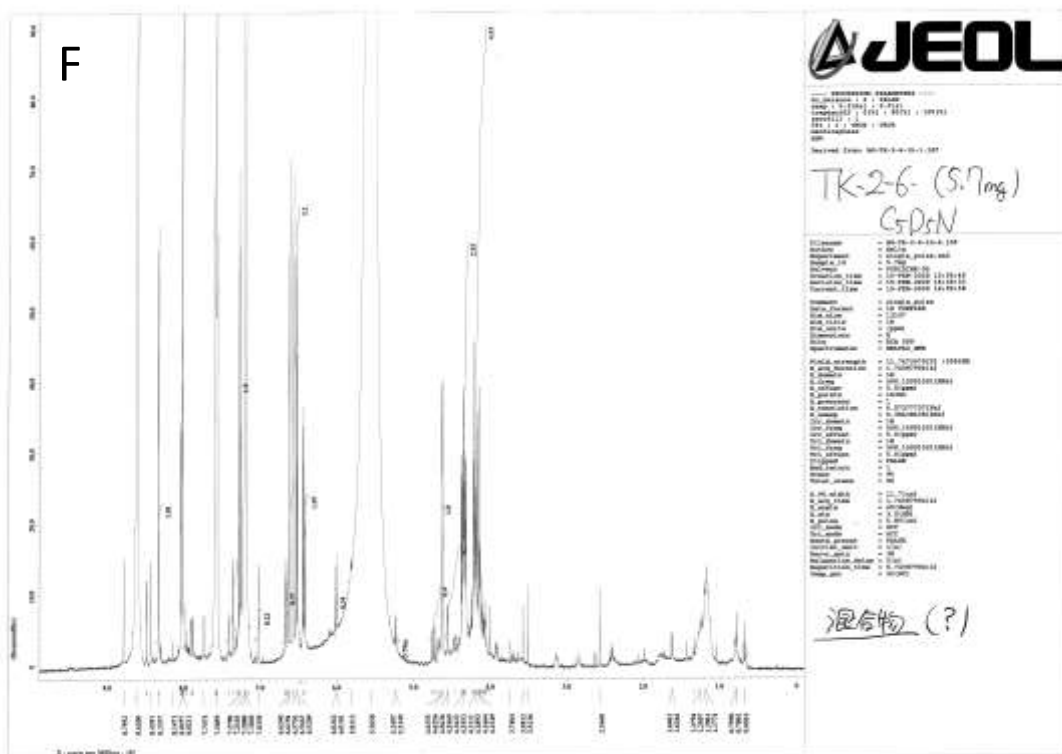
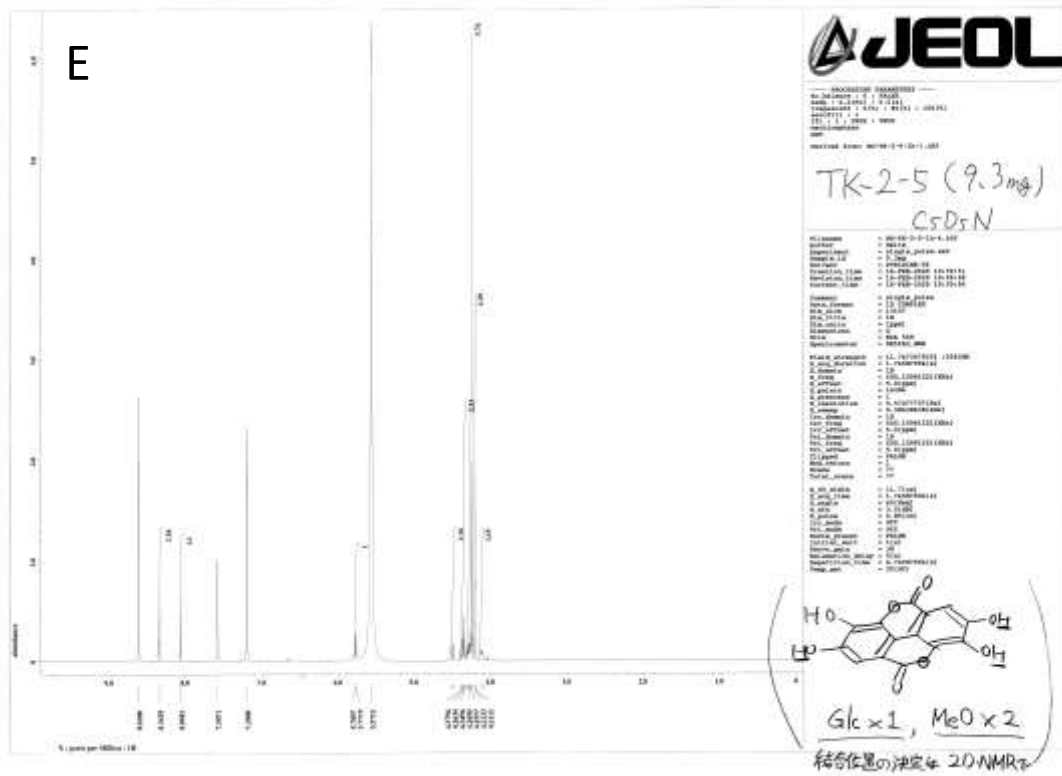
〈使用した器具及び機器〉

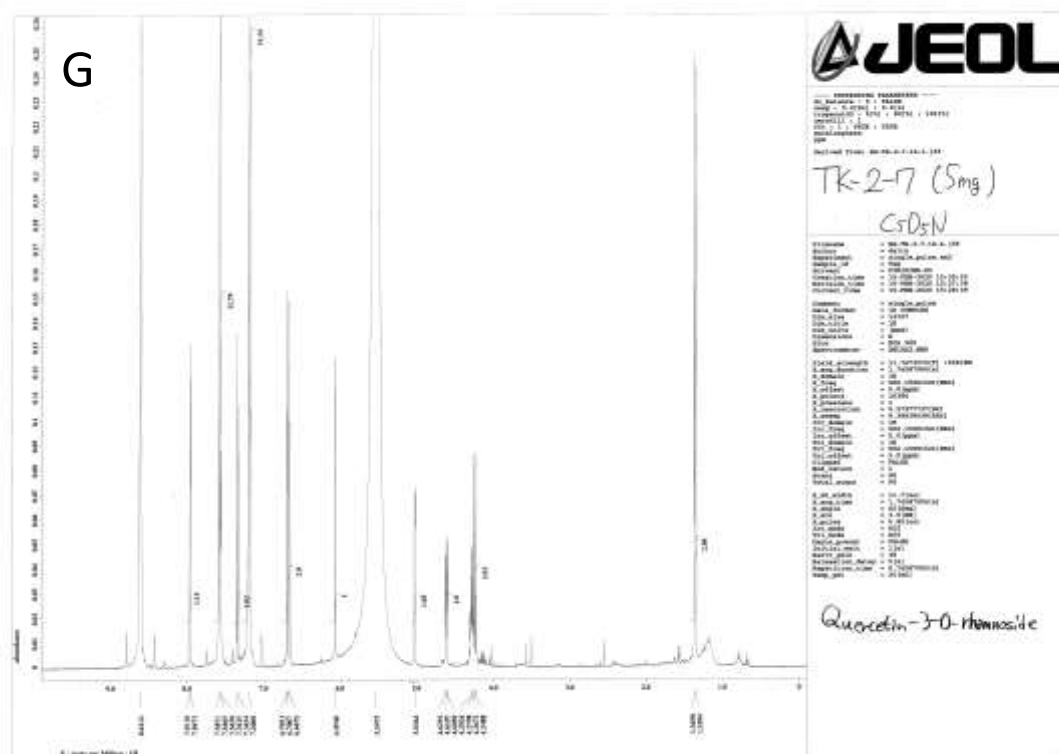
- 0.20 μm フィルター付きエッペンドルフチューブ : [東京硝子器械株式会社, UFC30LG00]
- インキュベーター : INCUBATOR [井内盛栄堂, IC-450]
- 0.45 μm フィルター : [ADVANTEC, 25CS045AS]
- 20 mL シリンジ : テルモシリンジ 20 mL [テルモ株式会社, SS-20ESZ]
- パスツールピペット : [CORNING, 7095D-9]
- イムノプレート : クリア平底イムノ未滅菌 96 ウェルプレート : [Thermo Fisher Scientific, 442404]
- サンプル管 : ラボランサンプル管瓶 : [アズワン株式会社, 9-851-05 No.3]

- ELISA リーダー：SPECTRA Fluor Plus [TECAN]
- エバポレーター：ROTARY EVAPORATOR [IWAKI, REN-1000]
- 分析天秤：分析天秤 [株式会社島津製作所, AUX120]
- 吹付け式試験管濃縮装置：[EYELA 東京理化学器械株式会社, MGS-2200]

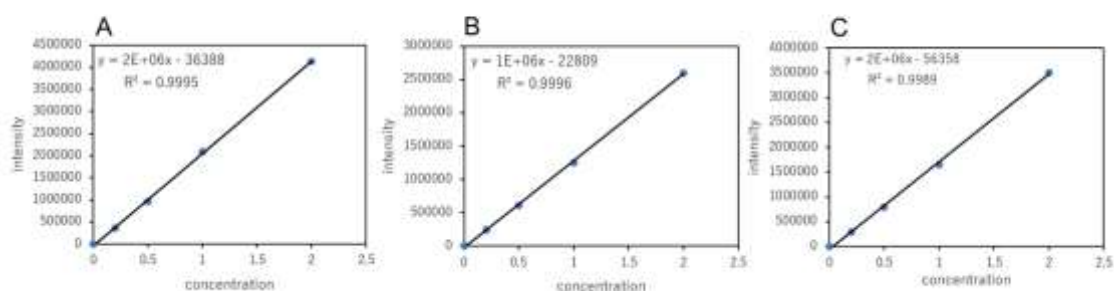
- HPLC
 - ポンプ：[株式会社島津製作所, LC-10AD]
 - オートインジェクター：[株式会社島津製作所, SIL-20A]
 - デガッサー：[株式会社島津製作所, DGU-12A]
 - カラムオーブン：[株式会社島津製作所, CTO-10A]
 - システムコントローラー：[株式会社島津製作所, CBM-20A]
 - バイアル [株式会社トムシク、200-2641]
 - セプタム [株式会社トムシク、022-6961]
 - スクリーキャップ [株式会社トムシク、200-2641]







Supplementary figure. 1. 各成分の ^1H NMR 構造解析結果: 単離した各成分を用いて ^1H NMR による構造解析を行った。解析の結果以下 A-G の構造が同定もしくは推定された。(A) myricetin-3-*O*-galactide + α の混合物、(B) ellagic acid、(C) myricitrin、(D) hyperoside + α の混合物、(E) 3,3'-di-*O*-methylellagic acid 4'-*O*-glucoside、(F) 夾雑物が多いため未同定、(G) quercitrin。



Supplementary figure. 2. 各フェノール類の検量線: HPLC で測定した (A) EA、(B) MR、(C) QR 標準物質の面積値に基づいて検量線を作成した。EA: ellagic acid, MR: myricitrin, QR: quercitrin。

Supplementary Table. 1. 各成分のエリア値

Conditions	ellagic acid			myricitrine			quercimelin		
	area value	Average	SD	area	average	SD	area	average	SD
Fluorescence	867303			1393935			794572		
	882455	917537.3	74273.79	1344162	1358430	30945.04	864238	813221.3	44710.97
	1002854			1337193			780854		
Red	1539286			1024024			553278		
	1279098	1398135	131496.2	1007062	1002657	23876.23	533862	537140.7	14773.43
	1376020			976885			524282		
Green	1349965			969806			507633		
	1326327	1328138	20979.73	1092506	1040815	63590.18	569070	544226	32359.78
	1308123			1060133			555975		
Blue	1258267			1205263			713131		
	1294578	1283787	22188.84	1073460	1152344	69632.39	634735	682058	41647.69
	1298517			1178310			698308		
Red/Green	1600743			1731235			1061235		
	1388582	1507359	108336.1	1382476	1629997	215539.8	851633	1009180	139031.2
	1532753			1776281			1114672		
Red/Blue	1569679			1409034			778039		
	1134942	1446715	272003.5	1284856	1323188	74486.75	709302	729135.7	42602.56
	1635525			1275673			700066		
Blue/Green	1388426			1456687			851913		
	1283174	1294036	89454.97	1697685	1577447	120499.9	984747	915977.7	66541.85
	1210508			1577970			911273		
White	1608334			1910160			974970		
	1792487	1695727	92433.15	1805957	1931246	137053.5	923865	984726.3	66280.25
	1686360			2077620			1055344		