

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05525

研究課題名(和文)テアフラビン類とリン脂質との分子間相互作用の解析

研究課題名(英文)Molecular interaction of theaflavins with phospholipids

研究代表者

中山 勉(NAKAYAMA, Tsutomu)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50150199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：テアフラビン類は紅茶に含まれる赤色色素であり、(1)紅茶の渋味の発現、(2)胆汁酸ミセルの凝集を通じた脂質やコレステロールの吸収阻害、(3)ウイルス不活化作用等が示唆されている。本研究は「これらの作用が共通してリン脂質をはじめとする生体物質との分子間相互作用の結果起こる」と仮定して、テアフラビン類や様々な紅茶とリン脂質二重膜であるリポソームと相互作用させ、濁度測定、原子間力顕微鏡を用いた観察、NMRによる解析等を行った。その結果、テアフラビン類の中でもtheaflavin-3-0-gallate (TF2A)や希釈した紅茶に強い作用が認められ、機構解明や紅茶の利用法につながる成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：最近、腸管から吸収されない難吸収性ポリフェノールの生理機能が注目されているが、その作用機構に関しては不明な点が多い。紅茶色素のテアフラビン類は典型的な難吸収性ポリフェノールであり、本研究の学術的意義はリン脂質膜との分子間相互作用を化学的に解析する点にある。

社会的意義：紅茶は水の次に人類の摂取量が多い飲料であるにもかかわらず、その赤色色素であるテアフラビン類の生理機能は未解明の部分が多い。本研究によってその作用機構が明らかになれば、生活習慣病の低減やウイルス不活化効果を最大限発揮できる紅茶の飲用法や紅茶成分の利用法を提言できる点にある。

研究成果の概要(英文)：Theaflavins are typical red pigments in black tea. They have been suggested to contribute to astringency of black tea, inhibition of absorption of lipids and cholesterol by aggregation of bile acid micelles, and inactivation of viruses. In this research it is assumed that these functions are commonly ascribed to the molecular interactions between theaflavins and biological substances, especially phospholipid membranes. After mixing various black tea solutions or respective theaflavins with liposomes, turbidity analysis, observation by atomic force microbalance and NMR analysis were carried out. Among four theaflavins theaflavin-3-0-gallate (TF2A) or various diluted black tea solutions have been shown to cause strong interaction with the liposomes. These results could be contributed to clarify the mechanisms of the functions of theaflavins and to apply effective utilization of black tea or its components.

研究分野：食品科学

キーワード：紅茶 紅茶ポリフェノール テアフラビン類 リン脂質膜 NMR 原子間力顕微鏡 リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

紅茶の赤色素でカテキン類の二量体であるテアフラビン(TF)類の機能が注目されている。例えば、紅茶の渋味の発現、胆汁酸ミセルの凝集反応に起因する“脂質やコレステロールの腸管での吸収阻害”、ウィルス不活化、血流の促進などである。TF類は腸管からの吸収が報告されておらず、典型的な難吸収性ポリフェノールと考えられている。一方、本研究の研究代表者は今まで緑茶に含まれるポリフェノールであるカテキン類とリン脂質膜との相互作用を研究してきた。その結果、カテキン類のうちECgやEGCgなどのガレート型カテキン類(没食子酸エステル)がリン脂質膜の表面に強い分子間相互作用を示し、それが抗酸化性、苦味、渋味、抗菌性等に大きく関わっていることを明らかにした。その後、TF類についても、モデルとしての胆汁酸ミセルやリポソームを用いて、リン脂質との分子間相互作用を調べ、TF類の中でも、theaflavin-3-*O*-gallate (TF2A)が強い作用を示すことを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) TF類の渋味の発現機構やウィルス不活化作用に関しては、TF類とリン脂質膜の分子間相互作用を胆汁酸非存在下で調べる必要がある。そこで本研究はこれらの作用が共通してリン脂質をはじめとする生体物質との分子間相互作用の結果起こるものと仮定して、TF類や様々な紅茶とリン脂質二重膜であるリポソームと相互作用させて詳しく解析することを目的とした。また、TF類のうちTF2Aがリン脂質と強い相互作用を示す理由を明らかにすることも目的とした。

(2)これまで、TF類とリン脂質との分子間相互作用をリン脂質の凝集(不溶化)による濁度上昇によって検出してきたが、生理的に生じうる低濃度のTF類が相互作用初期に起こすリン脂質膜の微細な構造変化を検出することを目的に、蛍光基質を挿入したリポソームを用いる測定系の構築を目指した。一方で、紅茶摂取時にTF類が口腔から消化管を通過する状況では、共存する食品由来のリン脂質やタンパク質などの他成分とも相互作用が起こり、TF類の生理活性や生体利用性(吸収性)に大きく影響すると予想した。そこで、他成分と事前に相互作用したTF類にリポソームを作用させ、相互作用した分子との間でTF類が吸着・脱着する可能性を検証することにした。特に、食品由来のリン脂質と生体膜モデルのリポソームとの間の分配を評価するにあたっては、前述の蛍光基質挿入リポソームを用いた測定系が有用と考えた。

(3) TF類とリン脂質膜に対する相互作用における親和性の違いが重要な因子であると推測し、さらにTF類とリン脂質膜との相互作用様式の差異によって活性強度の差を記述できるとの仮説を立てた。すなわち、TF類とリン脂質膜との相互作用の構造基盤を明らかにすることで、リン脂質膜親和性の観点からTF類の生理機能発現の初期段階が解明できると考えた。そこで本研究では、モデルリン脂質膜と核磁気共鳴(NMR)法を用いて、TF類とリン脂質膜との分子間相互作用様式を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞膜あるいはウィルス粒子表面のモデルとしてのリポソームとTF類との分子間相互作用を、リポソームの凝集から比較した。同様に様々な種類の紅茶についても比較した。

茶葉から淹れた紅茶は反応が強すぎて希釈する必要があったので、適度な希釈倍率を検討し、紅茶間の比較を行った。精製したTF類単独でもリポソームの凝集が見られたが、それが紅茶の凝集作用強度を説明できるか確認するため、紅茶そのものや、水溶性画分、脂溶性画分(ポリフェノールやそれ以外)などに分画した試料に含まれる、TF類、カテキン類、カフェイン等进行分析し、その寄与度を推定した。また、テアフラビン類と相互作用させたリポソームの形状変化を、原子間力顕微鏡(Atomic force microscope (AFM))を用いて観察した。

(2) 生体膜モデルに用いるリン脂質にはホスファチジルコリン(PC)を用い、リポソーム(small unilamellar vesicle(SUV))を調製した。PC膜表面に蛍光基質(ジフェニルヘキサトリエン(DPH))を挿入し、TF類を作用した時の蛍光偏光解消を測定した。食品由来他成分の共存効果については、TF類が不安定であるpH 7.0で安定化作用が期待される数種類の抗酸化物質を対象に、TF類の中で最も構造がシンプルなTF1への影響を解析した。TF類はHPLCで分析し、抗酸化物質のうちSH化合物のSH基は5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)による比色定量を行った。

(3) TF類のリン脂質膜親和性をimmobilized artificial membrane(IAM)カラムを用いてHPLC分析することにより評価した。次に、各TF類を重水中に溶解し、溶液NMR(^1H NMR, ^1H 縦緩和時間(T_1), NOESY)測定を行うことで、水溶液中におけるTF類の状態について分析した。続いて、1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine(DMPC)と1,2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DHPC)によって構成されるモデル生体膜(等方的バイセル)に各TF類を作用させ、同様の溶液NMR測定を行い、各NMRシグナルを帰属後、水溶液中で取得した結果と比較・解析した。さらにdiffusion ordered spectroscopy(DOSY)法を用いて、TF類の水溶液中およびリン脂質膜中における拡散係数を測定した。

4. 研究成果

(1) リポソームとの反応

リポソーム凝集反応条件の検討

[すでに報告した反応条件(a)] 研究代表者の中山と研究分担者の奈良井は、すでにTF類とリポソームの反応の結果、リポソームの凝集が起こることを報告しており、その時の反応条件は以下

の通りであった。

TF 類の水溶液 (20 μL) を 600 μL のリポソーム溶液 (卵黄レシチンの最終濃度 2.6 mM) (small vesicle solution/15 mM sodium phosphate buffer pH 6.5 containing 132 mM NaCl) に加え、攪拌してから 30 分後に吸光度 (595 nm) を測定した。

[本研究における反応条件(b)] TF 類の水溶液 (120 μL) を 480 μL のリポソーム溶液 (DPPC の最終濃度 2.0 mM、緩衝液は上記と同じ) に加え、攪拌してから 1 分間静置後に吸光度 (595 nm) を測定した。

[本研究における反応条件(c)] TF 類の水溶液 (40 μL) を 160 μL のリポソーム溶液 (DPPC の最終濃度 2.0 mM、緩衝液は上記と同じ) に加え、攪拌してから 1 分間静置後にハンディ型の光度計で吸光度 (575-660 nm) を測定した。

反応条件 (a) と (b) の違いはリポソームを構成するリン脂質が卵黄レシチンから dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) に変わったことである。これにより構成脂肪酸がすべて飽和脂肪酸になったためリポソームが酸化されにくくなり、安定性が増した。また、TF 類の水溶液をリポソーム溶液に加えて 1 分間静置後に測定することにより、迅速な測定が可能になった。反応条件 (b) と (c) の違いは反応容量の低減である。これにより TF 類とリン脂質の両方とも使用量が減少したため、その後、多数の試料の測定が可能になった。反応条件 (b) と (c) の違いに関して基本的には得られた結果に大きな差がないことを確認した。

TF 類によるリポソーム凝集反応の比較

反応条件 (b) により 4 種類の TF 類やカテキン類による DPPC リポソーム凝集反応の濃度依存性を比較すると図 1 のような結果が得られ TF2A と TF3 の凝集作用が明らかになった。

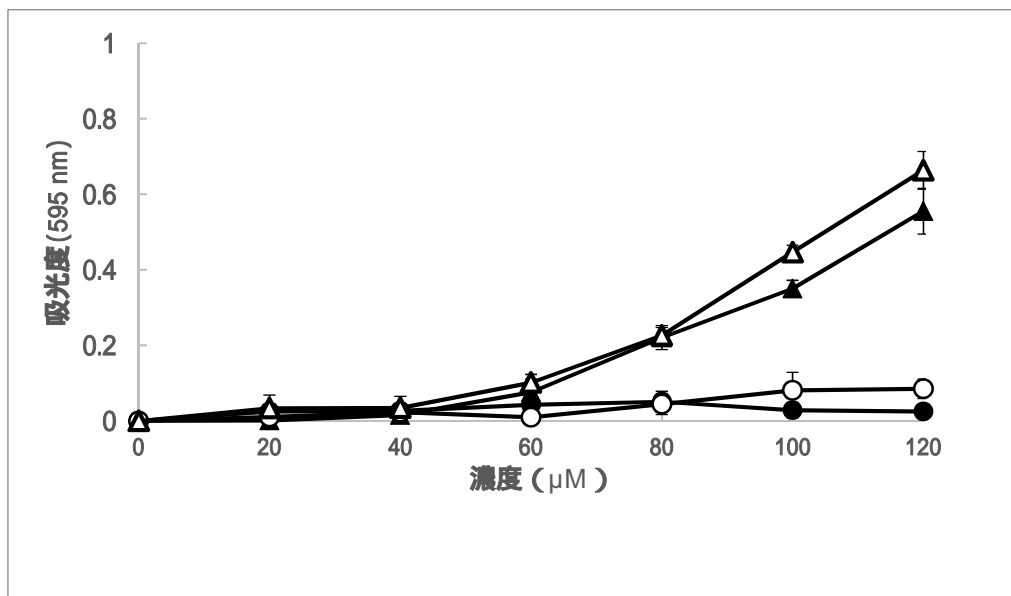


図 1 . TF 類の濃度に依存した濁度変化 TF1, TF2A, ○TF2B, TF3

この結果は少なくとも TF 構造の 3-0 における没食子酸エステル結合がリン脂質との分子間相互作用に関わっていることを示している。

抹茶類による比較

様々な種類の茶を一定条件で淹れ、それを水で希釈することにより、様々な相対濃度の茶を調製した。その結果、一般的に日常生活で飲用している紅茶であっても、リン脂質膜と相互作用する可能性が高いことが示された。

AFM による観察

マイカ基板上に固定した球形のリポソームは、TF 類 (TF1, TF2A, TF2B, TF3) と混合すると、全てにおいて複雑な形状に変化していた。このことから、リポソームと TF 類は相互作用していることが強く示唆された。現在、各濃度の変化と形状変化との関連について検討を進めている。

(2) 蛍光基質挿入リポソームを用いた測定系の構築と抗酸化物質やアミノ酸との反応

蛍光基質挿入リポソームを用いた測定系の構築

PC 膜表面に蛍光基質 DPH を挿入し、TF 類を作用した時の蛍光偏光解消測定を試みたところ、本研究で用いる SUV では蛍光基質の偏光特性を十分に得られず、初期蛍光偏光の安定条件を確立するに至らなかった。初期蛍光偏光が得られる multilamellar vesicle では、表面に露出する PC 濃度の再現性を保証できないため、SUV に最適な蛍光基質を選択、または蛍光基質挿入条件を検討することが今後の課題となった。

抗酸化物質の共存が TF 類に及ぼす影響

0.4 mM の TF1 を pH 7.0 のリン酸緩衝液中にて 37 °C でインキュベーションしたところ、経時的

に TF1 が減少したが、金属キレート作用をもつクエン酸を含む緩衝液中では TF1 の減少が抑制された。活性酸素種の生成に関わる微量の鉄イオンなどがキレートされることで、活性酸素種を介した TF1 の酸化が抑制されたと考えられる。さらに、高い電子供与性を示す酸化防止剤のアスコルビン酸(AsA)が共存する条件下では TF1 はさらに安定であった。

還元作用をもつ SH 化合物として、アミノ酸のシステイン(Cys)、*N*-アセチルシステイン(NAC)、そしてペプチドのグルタチオン(GSH)を選び、pH 7.0 のクエン酸-リン酸緩衝液中で TF1 に対する影響を調べた。0.4 mM の TF1 と 0.8 mM の SH 化合物を混合して 37 °C でインキュベーションしたところ、いずれも TF1 の減少と同時に SH 基の著しい減少が認められた(図 2)。Cys の SH 基が水酸基に置き換わったセリン(Ser)を添加しても TF1 はコントロールと変わらない変動を示した。また、Cys のアミノ基がアセチル基で保護された NAC では Cys よりも TF1 と SH 基の減少量が小さかったため、より反応性の高いアミノ基を側鎖にもつアミノ酸(リシン(Lys))と TF1 との反応を調べたが、Lys 添加では TF1 の変動にコントロールとの違いは認められなかった。これらの結果から、TF1 と SH 化合物の反応には SH 基が関わっており、さらに、SH 基の pKa 値が低い化合物ほど反応性が高いことから、チオラートアニオン(R-S⁻)による求核攻撃が反応機構に関与していることが示唆された。

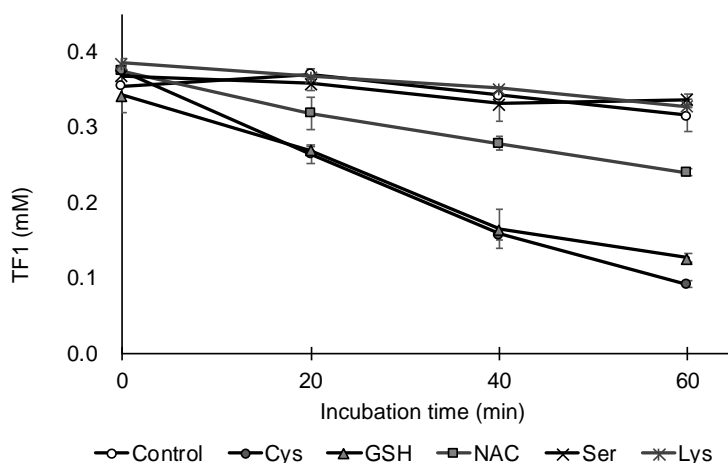


図 2. TF1 の安定性に対する SH 基含有アミノ酸 (Cys, NAC) とペプチド (GSH)、他アミノ酸 (Ser, Lys) の影響

今後、TF1 に SH 化合物が付加した生成物について NMR を用いて構造を特定するとともに、TF1 と異なる親水性/疎水性をもつことでリン脂質との相互作用が変化するのか解析を進める。さらに、TF2A, TF2B, TF3 についても SH 化合物との付加物形成の有無、リン脂質との相互作用に及ぼす影響を検証し、TF 類のもつ様々な生理活性の発現機構に食品や生体由来の SH 化合物が果たす役割について検討する予定である。

(3) リン脂質膜親和性の評価と NMR を用いた解析

リン脂質膜親和性の評価

4 種類の TF 類について IAM カラムを用いた HPLC 分析を行ったところ、各 TF 類のリン脂質親和性 (K_{IAM} 値) は TF3 > TF2B > TF2A > TF1 となり、先行研究での結果と一致した。分子中の galloyl 基の個数 (TF1: なし、TF2A および TF2B: 1 個、TF3: 2 個) の増加に伴いリン脂質との親和性が向上し、さらに逆相 HPLC での保持時間と K_{IAM} 値には相関がみられたことから、TF 類とリン脂質膜との相互作用には疎水性相互作用が支配的にはたっていることが示唆された。また、TF 類の構造中のフェノール性水酸基とリン脂質分子の親水性の頭部の酸素原子との間に水素結合が形成されるとの報告があることから、galloyl 基の導入により水酸基の数が増加したことにより TF 類とリン脂質との間で水素結合が形成され、その結果としてリン脂質膜に対する親和性が增大した可能性も考えられた。しかしながら、過去の報告あるいは 4-1 の結果において、TF2A と TF2B がリン脂質膜の凝集作用において異なる挙動を示す理由は本評価では明らかにできなかった。

溶液 NMR を用いた TF 類とリン脂質膜との相互作用解析

TF 類とリン脂質膜との分子間相互作用の詳細を解明するために、まず水溶液中およびリン脂質膜中で取得した TF1 の化学シフト値を比較したところ、TF1 のベンゾトロポロン環に由来する水素の化学シフトに顕著な変化が観測された。他の TF 類 (TF2A, TF2B, TF3) についても同様の測定を行ったところ、いずれの TF 類においてもベンゾトロポロン環に由来する NMR シグナルの顕著な低磁場シフト、広幅化、および消失が観測された。以上のことから、TF 類とリン脂質膜との分子間相互作用にはベンゾトロポロン環が重要な役割を担っていることが考えられた。一方、TF 類の共存下あるいは非共存下におけるリン脂質分子の化学シフト変化を解析したところ、

TF 類が相互作用することにより、リン脂質分子の極性基近傍 (β や γ 位) の水素に由来する NMR シグナルが比較的大きく変化した (図 3)。また、リン脂質二重層の内部に位置しているアルキル鎖部分の化学シフト変化が大きかった。このアルキル鎖部分の化学シフトの変化量が大きくなった要因として、炭素鎖は比較的自由に動けるため様々な配向状態に由来した化学シフト値が集合し、シグナルが広幅化したためであると考えた。以上のことより、TF 類はリン脂質膜表面付近に相互作用することが明らかとなり、分子間相互作用部位を特定することに成功した。

続いて、分子の運動性を評価するために ^1H 縦緩和時間 (T_1) の測定を行った (データ未掲載)。まずリン脂質分子側に着目したところ、 T_1 は TF 類非共存下において一番大きな値を示し、TF 類が相互作用すると T_1 の値が低下した。特に極性基近傍 (β や γ 位) において、 T_1 の低下がみられ、相互作用によって化学シフト変化が観測された部位と一致した。次に TF 類の T_1 を比較したところ、TF2A、TF2B および TF3 において、 T_1 はリン脂質膜と相互作用することで顕著に低下した。水溶液中において、各 TF 類の T_1 は分子内でも部位によって異なる値を示したが、リン脂質膜と相互作用すると、どの部位においても同様の T_1 に収束し、リン脂質分子側の T_1 と近い値を示した。これは TF 類が確かにリン脂質膜と相互作用しており、TF 類の運動性が低下していることを示唆している。TF 類がリン脂質膜と相互作用している事実は DOSY 法によって求められた拡散係数 (D) から確認することができた。リン脂質膜中の TF 類の D は水溶液中と比較して小さかった。TF 類はリン脂質膜と相互作用することによりリン脂質膜単独よりも小さい拡散係数を示したことから、TF 類はリン脂質膜と確実に相互作用していることが考えられ、前述した T_1 の結果を裏付けるものとなった。

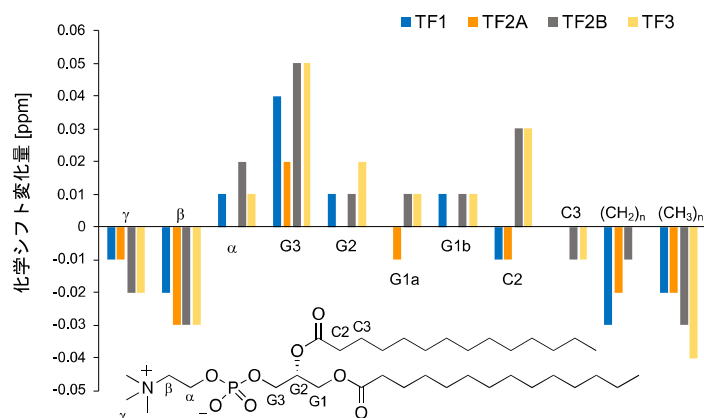


図 3. TF 類が相互作用したリン脂質分子の化学シフト変化量 [ppm] 変化量は、(TF 類共存下での化学シフト-TFs 類非共存下での化学シフト) で表している

さらに、リン脂質膜中における TF 類の存在位置の詳細と分子間相互作用様式を明らかにするために、核オーバーハウザー効果 (NOESY) 測定を行い、各分子間の空間的距離情報を取得した。NOESY 測定の結果、いずれの TF 類においても、ベンゾトロポロン環に由来する水素原子とリン脂質分子 γ 位水素原子との間で分子間 NOE が観測された。さらに、各 TF 類の A 環に位置する水素原子、および TF1 を除く TF 類の galloyl 基の水素原子と、リン脂質の β 位および γ 位水素との間で分子間 NOE 相関が観測された。したがって、これらの部位が近接して分子間相互作用していることが明らかとなり、TF 類がリン脂質膜表面付近と相互作用することが証明された。さらに興味深いことに、水溶液中とリン脂質膜中で観測された TF 類 (TF1, TF2A, TF3) の分子内 NOE 相関は異なるパターンを示した。このことから、これら TF 類は水溶液中とは異なる特定の立体構造をとってリン脂質膜と相互作用している可能性が考えられた。

(4) 総括

TF 類とリン脂質二重膜との分子間相互作用によって生じる脂質膜側の物理変化を、リポソームの凝集、AFM による観察、NMR による解析により明らかにした。特に NMR を用いた実験結果から、カテキン類と同様に TF 類も脂質膜の表面に局在することが明らかになった。4 種類の TF 類の中では TF2A の作用が際立っており、特定の部位にガロイル基が存在する効果が大きいと考えられる。この作用が TF 類さらには紅茶の、渋味、胆汁酸ミセルの凝集、ウイルス不活化などの様々な生理作用に関連すると考えられるが、どの程度、個々の生理作用につながるかについては今後の課題である。TF 類のアミノ酸との反応も見いだされ、脂質膜の表面に存在するタンパク質との反応も関与している可能性が考えられる。

紅茶のリポソーム凝集効果はかなり薄めた実験条件でも観測されており、通常の飲用でも関連する効果がもたらされている可能性が考えられる。食品成分の生理機能は活性物質を単離精製した段階で効果が消滅することがよくあるが、今回の結果はポリフェノール全体による効果の可能性が高く、今後様々な観点から解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植草 義徳, 陳 瀟逸, 鰐口 あおい, 倉田 幸一, 中山 勉, 木内 文之
2. 発表標題 テアフラビン類の抗炎症作用とリン脂質膜に対する親和性の評価
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳 瀟逸, 植草 義徳, 中山 勉, 木内 文之
2. 発表標題 NMRを用いたテアフラビン類とリン脂質膜との相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳 瀟逸, 植草 義徳, 中山 勉, 木内 文之
2. 発表標題 NMRを用いたテアフラビン類とリン脂質膜との相互作用解析（第2報）
3. 学会等名 日本薬学会第141大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奈良井 朝子 (NARAI Asako) (00339475)	日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・准教授 (32669)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植草 義徳 (UEKUSA Yoshinori) (30753024)	慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教 (32612)	
研究分担者	飯嶋 益巳 (IIJIMA Masumi) (40390728)	東京農業大学・応用生物科学部・准教授 (32658)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関