

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 年度 ~ 2008 年度  
 課題番号：19580147  
 研究課題名 (和文) 植物ポリフェノールと生体成分の分子間相互作用  
 研究課題名 (英文) Interaction of plant polyphenols with biological substances  
 研究代表者  
 中山 勉 (NAKAYAMA TSUTOMU)  
 静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
 研究者番号：50150199

研究成果の概要：植物ポリフェノール類（カテキン類）が生理機能を発揮するためには、生体成分、特にリン脂質二重層に対する相互作用が重要であると考えられる。本研究では、NMR を用いてカテキン類のリン脂質膜中における存在位置や動的挙動を明らかにした。さらに、植物ポリフェノール類のリン脂質膜に対する親和性を、リン脂質カラムを備えた HPLC 測定によって数値化する評価系を構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成 20 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：植物ポリフェノール、カテキン類、EGCg、リン脂質、HPLC、NMR、固体 NMR、親和性

1. 研究開始当初の背景

本報告書では、カテキン類に関して以下の略号を使う。(Fig. 1)

epicatechin (EC), epigallocatechin (EGC),  
 epicatechin gallate (ECg),  
 epigallocatechin gallate (EGCg)

食品は様々な機能を有し、栄養機能 (1 次機能)、嗜好に関する機能 (2 次機能)、生活習慣病のリスクを低減する効果などの生理機能 (3 次機能) の 3 種類に分類されている。

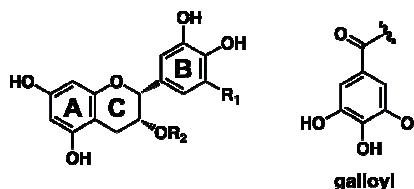


Fig. 1. Structures of tea catechins.

EC : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H  
 EGC : R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H  
 ECg : R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=galloyl  
 EGCg : R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=galloyl

1次機能と3次機能の根本的な違いは、前者が生命維持に必須な栄養素の機能であるのに対し、後者は必須でない成分の機能ということにある。したがって、前者の消化、吸収、代謝、細胞内への取り込み、シグナル伝達等が人間や動物が本来備えている生物学的なメカニズムによって遂行されているのに対し、後者の場合は、前者のために備えられているメカニズムの転用か、あるいはまったく別のメカニズム（例えば食物繊維の機能として推定されている物理的な吸着作用）によって遂行されていると考えられる。このため、3次機能を担う成分（機能性成分）の作用機構の解明は個別あるいは物質群ごとに進めざるを得ないが、栄養成分のそれに比べて未解明の部分が多い。

機能性成分の中でもカテキン、フラボノイド、イソフラボン、アントシアニン等のポリフェノール類の効果が注目されており、その生理機能がヒト、動物、動物細胞などの実験系で精力的に研究されている。最近では摂取されたポリフェノールが吸収されて血中にアグリコンあるいは抱合体として存在することも明らかになっている。いままでの研究から、カテキン類など同一グループ内の個々の物質において生理活性に大きな差があることが明らかになっているが、その理由は詳しく調べられていなかった。そこで、我々は植物ポリフェノール類（カテキン類）が生理機能を発揮するためには、生体成分、特にリン脂質二重層に対する相互作用が重要であり、その強度の差が活性の差に影響を及ぼしているという考えに至った。

## 2. 研究の目的

(1) 先行研究の溶液 NMR 実験と、重水素ラベルした EGCg を用いた固体 NMR 実験において、リン脂質膜中でのカテキン類の存在位置について解析を進めてきた。しかし、カテキン類とリン脂質膜との相互作用と生理活性強度との関連を調べ、さらに作用メカニズムを明らかにするためには、リン脂質膜中でのカテキン類のより詳細な挙動を解析する必要がある。そこで、化学合成した  $[^{13}\text{C}]$ -ECg (Fig. 2) とモデル生体膜である多重膜リポソーム (MLV) を用いて固体 NMR を測定し、カテキン類が相互作用したときのカテキン分子あるいはリン脂質膜の動的挙動を解析する。

(2) 先行研究の溶液 NMR を用いた NOESY 測定では、同種核 ( $^1\text{H}$ ) NOE 相関が、カテキン類の B 環と galloyl 基の水素原子あるいはリン脂質分子のトリメチルアミノ基 ( $\gamma$  位) の水素原子との間で観測されたことから、これら

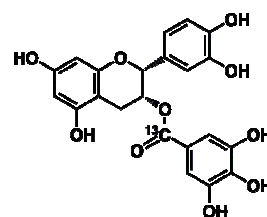


Fig. 2. Structure of  $[^{13}\text{C}]$ -ECg.

の部位が相互作用によって近接していることを明らかにした。本研究では、化学合成した  $[^{13}\text{C}]$ -ECg をバイセル膜に作用させて溶液 NMR を用いて異種核 NOE 相関を測定し、galloyl 基がリン脂質分子の  $\gamma$  位と近接していることを炭素原子で NOE を観測し確認する。

(3) 従来、カテキン類のリン脂質膜に対する親和性はリポソームへの取り込み量を測定することで評価していた。しかし、実験操作が煩雑であり、また取り込み量の少ない物質を定量することは困難であった。そこで、リン脂質膜を反映した、リン脂質分子を固定相に持つ特殊なカラム (Immobilized Artificial Membrane: IAM カラム) を用いて HPLC 分析を行い、その保持時間からポリフェノール類とリン脂質との親和性を簡便に解析できる系を構築する。この分析法により、微量試料でも簡便にリン脂質膜親和性が評価することができると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) $[^{13}\text{C}]$ -ECg の化学合成

$[^{13}\text{C}]$ -ECg の合成には、まずカルボキシ基を  $^{13}\text{C}$  で安定同位体ラベルした  $[^{13}\text{C}]$ -gallic acid を 1-bromo-3,4,5-trimethoxybenzene と  $[^{13}\text{C}]$ - $\text{CO}_2$  ガスを用いて 2 段階で合成した。次に、水酸基を塩化ピバロイル (PivCl) を用いて保護した後、カルボキシ基を酸無水物の形で活性化させた。さらに、フェノール性水酸基をクロロギ酸イソブチル ( $i$ BocCl) によって保護した EC とカップリングさせた。最後に塩基による脱保護を行った後、カラムクロマトグラフィー及び分取逆相 HPLC を用いて精製し、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg を得た。

### (2) メチル化カテキン類 (EGCg-4'OMe 及び EGCg-4',4''diOMe) の化学合成

EGCg のメチル化体である EGCg-4'OMe 及び EGCg-4',4''diOMe は入手困難であったため、化学合成によって得ることにした。EGCg を DMF (*N,N*-dimethylformamide) に溶解し、 $\text{CH}_3\text{I}$  と  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  を用いて水酸基を選択的にメチル化した。反応時間を制御することにより、EGCg-4'OMe 又は EGCg-4',4''diOMe のどちらか

を得た。反応液は液液分配した後、分取逆相 HPLC にて精製し、質量分析及び NMR 測定により目的物の確認を行った。

### (3) 固体 NMR 測定

固体 NMR の測定試料である  $[^{13}\text{C}]$ -ECg が作用している MLV は以下の方法で調製した。 $[^{13}\text{C}]$ -ECg と DMPC をモル比が 1:10 になるように量り取り、トリス緩衝液 (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.0) を加えて水和した。その後、凍結・融解操作を繰り返して固体 NMR 測定用 MLV 試料溶液を作製した。固体  $^{31}\text{P}$  及び  $^{13}\text{C}$  NMR 測定には DD-MAS 法と DD-static 法を用いた。固体 NMR は、Chemagnetics CMX infinity-400 分光器を用いて測定した。主な各測定パラメータは以下の通りである。共鳴周波数, 161.15 MHz ( $^{31}\text{P}$ ), 100.11 MHz ( $^{13}\text{C}$ );  $90^\circ$  パルス, 5.0  $\mu\text{s}$  ( $^{31}\text{P}$ ), 5.6  $\mu\text{s}$  ( $^{13}\text{C}$ );  $^1\text{H}$  デカップリングパルス, 50 kHz ( $^{31}\text{P}$ ), 45 kHz ( $^{13}\text{C}$ ); 繰り返し時間, 2.0 s ( $^{31}\text{P}$ ), 4.0 s ( $^{13}\text{C}$ ).

### (4) 溶液 NMR 測定

溶液 NMR の異種核 NOE 相関実験には、バイセル膜に  $[^{13}\text{C}]$ -ECg を作用させて測定した。MeOH に溶解させた  $[^{13}\text{C}]$ -ECg を DMPC と DHPC の  $\text{CHCl}_3$  溶液と混合した ( $[^{13}\text{C}]$ -ECg : DMPC : DHPC = 0.48 : 1 : 2)。エバポレータと真空ポンプで溶媒を完全に除去して脂質フィルムを作製し、 $\text{D}_2\text{O}$  にて水和した (最終総脂質濃度 8% w/v)。バイセル膜を構成するリン脂質分子の  $\gamma$  位の水素原子に対して選択的にパルス照射して飽和し、異種核である炭素原子で NOE を観測した。溶液 NMR は、JEOL JNM- $\alpha$ 400 分光器を用いて測定した。主な各測定パラメータは以下の通りである。共鳴周波数, 399.65 MHz ( $^1\text{H}$ ), 100.40 MHz ( $^{13}\text{C}$ ); 励起パルス, 6.5  $\mu\text{s}$  ( $^1\text{H}$ );  $^1\text{H}$  選択的照射パルス, 50  $\mu\text{s}$ ; 繰り返し時間, 3.0 s.

### (5) リン脂質膜親和性の数値化

リン脂質膜親和性は IAM カラムを備えた HPLC 測定により評価した。各ポリフェノール試料は MeOH に溶解させて調製し、HPLC の移動相を 15% (アントシアニン類), 20% (カテキン類), 30% (その他のポリフェノール類) MeCN (100 mM NaCl, pH 2.5) に設定し測定した。得られた各ピークの保持時間 ( $t_r$ ) を (式 1) に代入して  $K_{\text{IAM}}$  という定数でリン脂質親和性を算出した。なお、 $t_0$  は IAM カラムに保持されないクエン酸等の溶出時間である。

$$K_{\text{IAM}} = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} \quad (\text{式 1})$$

主な HPLC 測定条件を以下に示す。カラム, IAM. PC. DD2 (4.6  $\times$  150 mm); 流速, 1.0 mL/min; サンプル注入量, 10  $\mu\text{L}$ ; カラム温度,  $30^\circ\text{C}$ ; 検出 UV 波長, 200 nm.

## 4. 研究成果

### (1) 固体 NMR 測定

カテキン類には巨大リポソームの破壊を誘導するという報告がある。しかし、本研究で作製した MLV 試料の固体  $^{31}\text{P}$  NMR (DD-static) 測定において、異方性を示す固体 NMR で特徴的なパウダーパターン (粉末線形) が観測されたため、この実験系では MLV は  $[^{13}\text{C}]$ -ECg によって破壊されないということを確認した。さらに得られたパウダーパターンの解析により、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg が作用した MLV は磁場中において楕円に近い形状で配向していることが明らかとなった。DMPC で構成される MLV の相転移温度は  $23^\circ\text{C}$  である。しかし、今回の測定では相転移温度以下である  $20^\circ\text{C}$  においてもパウダーパターンが観測された。これらの結果は、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg がリン脂質膜の性質を変化させているためであると推測できる。さらに、カテキン類非存在下と比較して、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg 存在下では  $^{31}\text{P}$  NMR の化学シフト異方性及び DD-MAS 法で得られる  $\delta_{\text{iso}}$  値 (等方化学シフト値) に変化が見られた。従って、カテキン類は相互作用することによりリン脂質膜、特にリン脂質分子のリン酸基付近の運動性に影響を与えていることが示唆された。

一方、水和試料の固体  $^{13}\text{C}$  NMR (DD-static) 測定では、 $\delta_{\text{H}}$  と  $\delta_{\text{L}}$  の 2 軸で表される軸対称パウダーパターン (Fig. 3A) を示し、化学シフト異方性が観測された。この得られたスペクトルは  $\delta_{\text{L}}$  成分が強く出ているため、 $[^{13}\text{C}]$ -ECg はリン脂質二重層中で膜法線の周りで 1 軸対称回転運動を行っていることが示唆された。また、固体  $^{13}\text{C}$  NMR (DD-MAS, 2000 Hz) 測定において  $\delta_{\text{iso}}$  値が観測され (Fig. 3B)、DD-static 法で得られた化学シフト異方性との解析により、ECg はリン脂質膜中で異方性を持った運動を有していることが確認された。先行研究において、 $[^2\text{H}]$ -EGCg の運動性に関する情報を得ることに成功しているが、今回の測定結果も同様の結果であった。今後はリン脂質膜中でのカテキン分子の運動性だけでなく、より正確な存在位置情報を得るために、 $^{31}\text{P}$ - $^{13}\text{C}$  rotational echo double resonance (REDOR) 法を用いて  $[^{13}\text{C}]$ -ECg のカルボニル炭素 (ラベル部位) とリン脂質分子のリン原子との原子間距離測定を行う予定である。

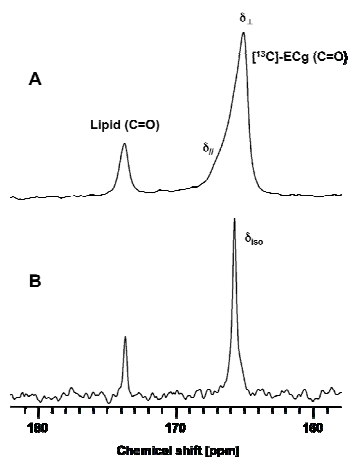


Fig. 3. Solid-state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of  $^{13}\text{C}$ -ECg (C=O) in DMPC liposomes under the DD-static (A) and DD-MAS (B).

## (2) 溶液 NMR 実験

バイセル膜を構成しているリン脂質分子の  $\gamma$  位の水素原子に対して選択的にパルス照射して飽和し、異種核である炭素原子で NOE を観測した。その結果、リン脂質分子の  $\gamma$  位と  $\beta$  位炭素原子への分子内異種核 NOE 相関だけでなく、 $^{13}\text{C}$ -ECg のカルボニル炭素原子への分子間異種核 NOE 相関も観測された (Fig. 4)。従って、カルボニル炭素を含む galloyl 基はリン脂質分子の  $\gamma$  位と近接していることが示された。この結果は、NOESY 実験で得られた結果を強く支持し、カテキン類がリン脂質膜表面と相互作用するという確かな証拠を得た。

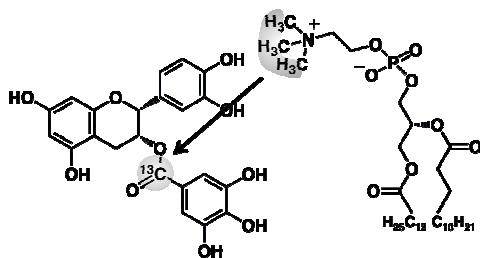


Fig. 4. The intermolecular-heteronuclear NOE correlation.

(1) の固体 NMR 測定及び (2) の溶液 NMR 測定の結果は新規合成した  $^{13}\text{C}$ -ECg を用いたことにより得られたものであり、 $^{13}\text{C}$ -ECg の有用性が認められた。また、 $^{13}\text{C}$  ラベル化されたカテキン類を多段階合成により作製し、それを研究に用いている研究例は今までに無く、先駆的である。今後、 $^{13}\text{C}$ -ECg や本研究で用いた手法は、リン脂質膜との相互作用解析だけでなく、他の生体成分 (糖類やペプチド、タンパク質など) とカテキン類の相互作用解析にも応用できると期待される。

## (3) リン脂質膜親和性の数値化

IAM カラムを用いたカテキン 4 種類 (EC, EGC, ECg, EGCg) の HPLC 分析の結果、リン脂質への親和性の強さは  $K_{IAM}$  値が大きい順に  $\text{ECg} > \text{EGCg} > \text{EC} > \text{EGC}$  となり、先行研究におけるリポソームへの取り込み量、そして *n*-octanol/PBS 系での分配係数と強い相関を示した (Fig. 5)。このことから、化学構造の違いによるカテキン類の疎水性の強弱がリン脂質膜への相互作用の違い (リン脂質膜親和性) を決定づけていることが示唆された。

他のポリフェノール類 (フラボン類 5 種、フラボノール類 6 種、イソフラボン類 8 種、アントシアニン類 5 種、アントシアニン類 3 種) についても同様に、IAM カラムを用いてリン脂質膜親和性を測定した。その結果、リポソームへの取り込み量や疎水性に反映した各  $K_{IAM}$  値を得た。アントシアニン類やアントシアニン類はリポソームへ取り込まれる量が少なく、今までリン脂質膜親和性を測定することが困難であったが、本法を用いることで簡便に測定することが可能になった。

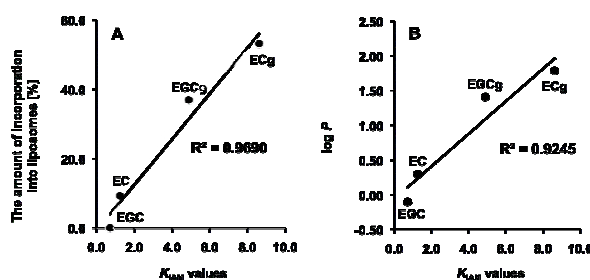


Fig. 5. Correlation of  $K_{IAM}$  values and the amount of incorporation into liposomes (A) and  $\log P$  (B).

メチル化カテキン類の  $K_{IAM}$  値は  $\text{EGCg-4', 4''diOMe} > \text{EGCg-4'OMe} > \text{EGCg-4''OMe} > \text{EGCg-3'OMe}$  であった。一方、*n*-octanol/PBS 系にて分配係数を測定したところ、EGCg-4', 4''diOMe は IAM カラムでの結果と同様に高い値を示したが、それ以外のメチル化カテキン類に関しては全く相関が見られなかった。前述したように、カテキン類に関しては化学構造の違いによる疎水性の強弱がリン脂質膜への親和性を反映していたが、メチル化カテキン類には疎水性以外の要因もリン脂質膜への相互作用に影響を与えている可能性が考えられた。今後は、メチル化カテキン類をバイセル膜に作用させて溶液 NMR を測定し、相互作用様式がカテキン類と異なるのかどうかを調べる予定である。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yoshinori Uekusa, Yuko Takeshita, Takeshi Ishii, and Tsutomu Nakayama. Partition coefficients of polyphenols for phosphatidylcholine investigated by HPLC with an immobilized artificial membrane column. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 3289–3292 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① Yoshinori Uekusa, Yuko Takeshita, Takeshi Ishii, Miya Kamihira, Shigenori Kumazawa, Akira Naito, and Tsutomu Nakayama. Interaction between tea catechins and biological membranes. 第30回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2008年8月7日, 札幌コンベンションセンター

② Yoshinori Uekusa, Miya Kamihira, Takeshi Ishii, Shigenori Kumazawa, Kozo Nakamura, and Tsutomu Nakayama. Dynamic behavior of tea polyphenols interacting with lipid bilayers as determined by NMR spectroscopy. *3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health.*, 2007年11月26日, 京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 勉 (NAKAYAMA TSUTOMU)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授  
研究者番号：50150199

### (2) 研究分担者

石井 剛志 (ISHII TAKESHI)  
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教  
研究者番号：50448700

内藤 晶 (NAITO AKIRA)  
横浜国立大学・工学研究院・教授  
研究者番号：80172245