

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650493

研究課題名(和文) 難吸収性ポリフェノール類の渋味刺激を受容する消化管分子標的の探索と受容機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of astringent reception in gastrointestinal tract by poorly absorbable polyphenols

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：難吸収性ポリフェノールが消化管内で渋味物質として生体成分に作用することで、体内に取り込まれることなく生理作用を惹起すると仮説を立て、その分子受容機構を明らかにすることを目的として研究を実施した。渋味を呈するポリフェノールの細胞膜上における分子挙動を人工リン脂質膜センサを備えたQCM法と人工リン脂質膜を塗布した96穴プレートを基盤とした比色法等を駆使して解析した結果、難吸収性ポリフェノールであるガレート型テアフラビンは生体成分に強く相互作用して渋味を呈するだけでなく、脂質膜表面に蓄積して渋味刺激を生体に与えることで、特有の生理作用を惹起する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Based on QCM- and 96-well plate-based method with phospholipid polymer as models of phospholipid membranes, it was indicated that gallate-type theaflavins interact and accumulate with the surface of lipid membranes. In addition, the gallate-type theaflavins was indicated to be more astringent than the nongallate-type theaflavin, both of their tastes and absorption could be ascribed to the interaction. We propose that when the poorly absorbable polyphenols such as theaflavins exert their biological activities, they interact with the phospholipid membranes, accumulation on their surface and consequently bind to membrane-associated proteins, such as receptors.

研究分野：食品科学

キーワード：ポリフェノール 渋味 吸収性 分子会合性 相互作用 テアフラビン

1. 研究開始当初の背景

食品の機能性研究の多くは、食品成分が腸管から吸収された後に標的細胞に作用することを想定している。例えば、皮膚や消化管上皮などを除く培養細胞を用いた実験系は、食品成分やその代謝物が吸収されたことを前提としている。植物ポリフェノールは *in vitro* 実験において様々な生理作用を示すが、化合物によっては消化管吸収性が低く体内にほとんど取り込まれない。このような難吸収性ポリフェノールとしては、茶に含まれるカテキン類、テアフラビン類およびテアルビジン類、カカオやワインに含まれるプロシアニジン類やタンニン酸などがあり、タンパク質やリン脂質膜などの生体成分に対する結合親和性が高く強い渋味を呈することが特徴である。難吸収性ポリフェノールの多くは体内に極微量しか取り込まれないが、*in vivo* 実験において様々な疾患予防効果が報告されていることから、消化管内で作用して何らかの生体応答を惹起している可能性がある。

消化管粘膜で感受された情報は、消化管壁内に存在する腸管神経系により中枢神経系とは独立して伝達される。消化管粘膜には様々な受容体が発現しており、近年では口腔内に存在する様々な味覚受容体が発現していることも報告された。すなわち、消化管は口腔内と同様に摂取した味物質を体内に取り込む前に感受し、生体応答を惹起する化学物質の感覚器官といえる。最近では、消化管における味物質の受容機構の解明が食品の機能性研究における新たなアプローチとして認識されはじめています。

渋味は物質と生体成分の相互作用により引き起こされる味覚刺激であり、「渋味物質が唾液タンパク質と結合・沈殿することで物理的に感じる触覚」と「渋味物質が舌上皮細胞や味細胞の膜上に存在するタンパク質に結合することで化学的に感じる味覚」の複合感覚と考えられている。生体成分に対する結合親和性の高い物質が必ずしも渋味を呈するわけではないために、渋味物質に共通する何らかの受容機構やそれを担う分子標的(受容体など)が存在する可能性がある。茶ポリフェノール類の生体成分に対する親和性の強弱は渋味の強弱と相関することから、渋味の強さは口腔内だけでなく消化管全体にも何らかの影響を及ぼすものと考えられる。したがって、難吸収性ポリフェノールは、消化管内で渋味物質として生体成分に作用することで、体内に取り込まれなくても生体成分と相互作用することにより生理作用を惹起できる可能性があるが、詳細な解析は成されていない。

2. 研究の目的

難吸収性ポリフェノールが消化管内で渋味物質として生体成分に作用することで、体内に取り込まれることなく生理作用を惹起すると仮説を立て、その分子受容機構を明ら

かにすることを目的として、渋味を呈するポリフェノールの細胞膜上における分子挙動を解析するとともに、結合親和性の高い標的分子を探索することで、難吸収性ポリフェノールの消化管受容機構の解明を試みた。また、実験動物を用いて、難吸収性ポリフェノールに特有の生体応答の探索・解明を試みた。

3. 研究の方法

紅茶に含まれる渋味物質であるテアフラビン類は、緑茶に含まれるカテキン類とは異なり、これまでに体内に吸収されることを示す証拠が殆ど得られていないため、生理作用の発現機構に関する知見が少ない。そこで難吸収性ポリフェノールとして、テアフラビン(TF1)、テアフラビンモノガレート(TF2A、TF2B)およびテアフラビンジガレート(TF3)を用いた(図1)。

まず、テアフラビン類の渋味を味認識装置により評価した。次に、ネイティブ電気泳動法によりポリフェノールの会合性を評価する方法を構築し、テアフラビン類の水溶液中での分子会合性をネイティブ評価した。さらに、先行研究により構築したポリフェノールの脂質膜への結合性を評価する複数の方法を利用して、テアフラビン類のリン脂質膜に対する結合特性(結合量、結合定数およびそれらに DMSO が与える影響)を評価した。そして、並列人工膜透過測定法を利用した透過試験を利用して、消化管吸収性を評価した。得られた結果を基に、各テアフラビン類の細胞膜上での分子挙動を推定し、標的分子の解明に向けた探索プローブの開発・適用を試みた。

マウスを用いた動物実験を、研究分担者をはじめとする共同研究者と実施し、二糖類水分解酵素の活性やエネルギー代謝に及ぼす影響を評価した。

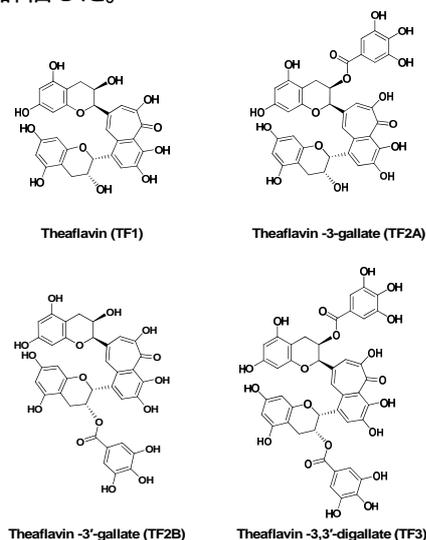


図1. テアフラビン類の化学構造

4. 研究成果

味認識装置により渋味を評価した結果、テ

アフラビン類の渋味は、ガロイル基の存在により強くなり、TF1（ガロイル基を持たない）に比べてTF2AとTF2B（ガロイル基をそれぞれ異なる位置で1つ持つ）やTF3（ガロイル基を2つ持つ）で高かった（図2）。本結果を基に、生体成分に対する結合性との関連性を評価し、ガロイル基の存在によりタンパク質凝集性や脂質膜結合性が高くなること、テアフラビン類の渋味の発現・強化に関与することを明らかにした（成果・論文 など）。

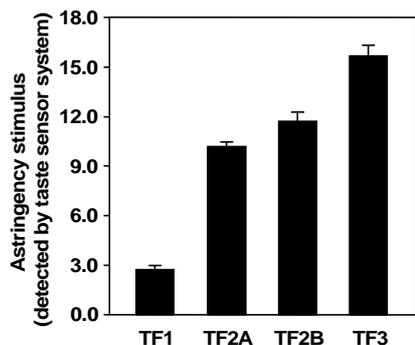


図2. 味認識装置により評価したテアフラビン類の渋味

ネイティブ電気泳動法における物質の泳動度と染色強度から水溶液中におけるポリフェノールの分子会合性を評価する方法を構築した（成果・論文）。水溶液中での分子会合性は、TF1（ガロイル基を持たない）に比べてTF2AとTF2B（ガロイル基をそれぞれ異なる位置で1つ持つ）やTF3（ガロイル基をそれぞれ異なる位置で1つ持つ）で高かった。見かけ上の分子の大きさは、TF3が最も大きく、次いでTF2B、TF2A、TF1の順であった（図3）。本結果より、ガレート型テアフラビン類は水溶液中で自己会合し、より分子サイズの大きな複合体として存在することが示唆された。

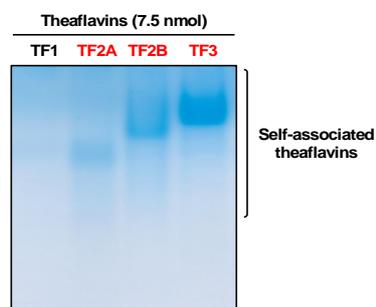


図3. テアフラビン類の水溶液中での分子会合性

先行研究で開発した脂質膜センサを利用した水晶発振子マイクロバランス法（特開2010-138111）と96穴プレートによる比色法（特開2013-108829）を改良・応用して、テアフラビン類の脂質膜への結合性を評価し

た。脂質膜への結合量は、TF2B（ガロイル基を1つ持つ）やTF2Aが多く、次いでTF3（ガロイル基を2つ持つ）、TF1（ガロイル基を持たない）の順であった。リン脂質膜への結合量は、DMSO濃度を高めることで減少し、最終的に結合量の差が認められなくなった（図4）。脂質膜に対する結合定数は4種類の間で顕著な違いは認められなかった（表1）。本結果より、ガレート型テアフラビン類は脂質膜表面に結合した後に、そこを起点として分子同士で会合することで膜表面に蓄積することが示唆された。また、結合量はTF2AやTF2B（ガロイル基をそれぞれ異なる位置で1つ持つ）がTF3（ガロイル基を2つ持つ）よりも多いことを確認した。

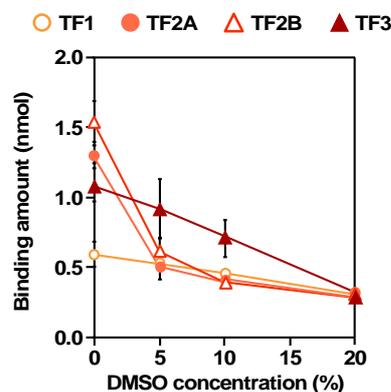


図4. テアフラビン類の脂質膜表面に対する結合量

表1. テアフラビン類の脂質膜に対する結合定数

	*K _a (M ⁻¹)	
	Non-linear regression	Kinetic analysis
TF1	0.2 × 10 ⁴ ± 0.8 × 10 ²	0.4 × 10 ⁴ ± 4.1 × 10 ³
TF2A	1.2 × 10 ⁴ ± 1.3 × 10 ³	0.4 × 10 ⁴ ± 3.2 × 10 ³
TF2B	1.4 × 10 ⁴ ± 5.2 × 10 ³	0.3 × 10 ⁴ ± 1.1 × 10 ³
TF3	1.8 × 10 ⁴ ± 2.9 × 10 ³	1.7 × 10 ⁴ ± 6.5 × 10 ³

*K_a: Association constant

脂質膜における透過性は、DMSOの存在下ではTF1に比べてTF2AおよびTF3で低く、TF2Bでは確認できなかった（図5左）。またDMSOの非存在下ではTF1以外の透過性が確認できなかった（図5右）。本結果より、テアフラビン類は脂質膜透過性が低く、TF1（ガロイル基を持たない）を除くと、受動的な膜透過性がほとんどないことが示唆された。なお、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞を用いた細胞膜透過性試験においても、TF1にのみ僅かに透過性が観測されたが、ガレート型テアフラビン類においては透過性が全く確認できなかった。

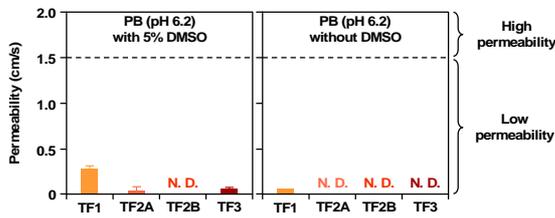


図 5. テアフラビン類の脂質膜透過性

テアフラビン類は、ガロイル基の有無やその数と位置の違いによって、水溶液中や膜上での会合挙動が異なることが予想される。テアフラビン類の基本骨格 (TF1) は、会合性が低い上に脂質膜透過性を備えているが、ガロイル基の存在 (TF2A、TF2B、TF3) により水溶液中やリン脂質膜上での会合性が高まるとともに脂質膜に対する透過性が低下する。テアフラビン類のガロイル基は、それ自身が分子を嵩高くすることで脂質膜に対する透過性を低下させるだけでなく、水溶液中や生体成分 (脂質膜や蛋白質) の表面で会合してより嵩高い分子集合体を形成することで脂質膜透過性を低下させることが予想される (図 6)。

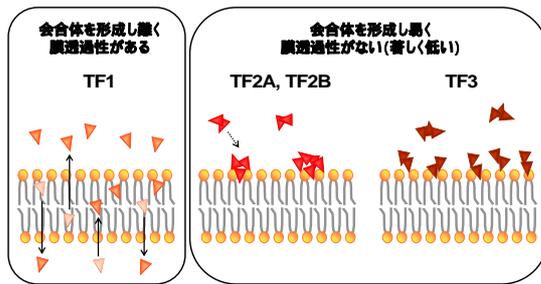


図 6. 推定される紅茶ポリフェノールの水溶液中や脂質膜に対する会合挙

マウスを用いた動物実験において、膜透過性が低く膜への結合量が多い TF2A、TF2B やプロシアニジン類は、吸収されずとも短時間で血流促進などの生体応答を示したことから (成果・論文) 得られた成果はテアフラビン類をはじめとする難吸収性ポリフェノールの機能性の発現機構を評価する上で有用な知見であると予想される。現在、作製したテアフラビン類と親和性の高い生体タンパク質の精製に資するテアフラビン結合セファロース (成果・学会) を用いて、難吸収性ポリフェノールの渋味刺激を受容する標的分子の探索を進めている。

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 3 件)

Aruga N., Toriigahara M., Shibata M., Ishii T., Nakayama T., and Osakabe N.: Responses to a single dose of different polyphenols on the microcirculation and systemic circulation in rats, *J. Funct. Foods*, 10, 355-363 (2014). 査読有 DOI: 10.1016/j.jff.2014.06.025

安井美奈、石井剛志: ネイティブ - ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる茶ポリフェノール会合体の検出法、分析化学、63、687 - 692 (2014). 査読有 DOI: 10.2116/bunsekikagaku.63.687

Nakayama, T., Ishii, T., Uekusa, Y., Kato, K., and Kumazawa, S.: Interaction of tea catechins with phospholipids - roles in their tastes and biological activities, *J. Food Drug Anal.*, 20, 305-308 (2012). 査読無

〔学会発表〕(計 15 件)

石井剛志、竹内由紀、安井美奈、保田倫子、下位香代子、小林彰子、越阪部奈緒美、中山 勉: テアフラビン類の難吸収性に影響する因子の解析、第 11 回日本カテキン学会年次学術大、2014 年 11 月 22 日 (東京)

石井剛志、竹内由紀、安井美奈、小林彰子、保田倫子、下位香代子、越阪部奈緒美、中山 勉: テアフラビン類の脂質膜における分子挙動、第 19 回日本フードファクター学会、2014 年 11 月 9 日 (鹿児島)

齊藤晃子、中里李沙、柴田政廣、石井剛志、中山 勉、福井敏樹、越阪部奈緒美: テアフラビン摂取後の急性的な循環動態の変化動、第 19 回日本フードファクター学会、2014 年 11 月 9 日 (鹿児島)

石井剛志、安井美奈、竹内由紀、中山 勉: 脂質膜透過性の低い茶ポリフェノールの会合挙動解析、日本分析化学会第 63 年会、2014 年 9 月 19 日 (広島)

Mori T., Katsumata T., Akagawa M., Nakayama T., and Ishii T.: Development and application of a new probe for searches for the high-affinity proteins of gallate-type catechins, 27th International Conference on Polyphenols, 2014 年 9 月 5 日 (名古屋).

工藤直人、新井泰範、神尾直哉、渡辺悠人、石井剛志、中山 勉、越阪部奈緒美: Theaflavin のマウスエネルギー代謝への影響、日本農芸化学会大会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日 (神奈川)

Ohta, Y., Asanuma, T., Suzuki, T., Nakayama, T., and Ishii, T.:

Polyphenol-caffeine complexes mediate tea creaming in black tea, The 5th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science 2013 年 11 月 7 日 (Shizuoka, Japan)

安井美奈、加藤大地、中山 勉、石井剛志：ネイティブ電気泳動を利用したポリフェノール会合体の検出法とその応用、日本食品科学工学会第 60 回記念大会、2013 年 8 月 30 日 (東京)

Nakayama, T. and Ishii, T.: Tea polyphenols: bane or bonanza? Interaction with phospholipids and proteins., Pharma-Nutrition 2013, 2013 年 4 月 16 日 (Singapore)

Nakayama, T. and Ishii, T.: Molecular interaction of tea catechins with phospholipids-roles on their biological activities and tastes, The 1st International Conference on Pharma-Food, 2012 年 11 月 15 日 (Shizuoka, Japan)

竹内由紀、石井剛志、中山 勉：テアフラビン類とリン脂質膜との分子間相互作用の解析、第 17 回日本フードファクター学会学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会合同大会 2012、2012 年 11 月 11 日 (持す丘)

石井剛志、勝間田知治、北村実穂、山田静雄、中山 勉：生体成分との非特異的な相互作用は茶カテキン類の生理活性強度を低下させる、第 17 回日本フードファクター学会学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会合同大会 2012、2012 年 11 月 10 日 (静岡)

林 美香、石井剛志、勝間田知治、中山 勉：フラボノイド結合担体を用いた生体標的分子の分離法、日本分析化学会第 61 年会、2012 年 9 月 19 日 (金沢)

中山 勉、石井剛志：ポリフェノールの味質と機能～分子間相互作用の立場から～、2012 年 5 月 23 日 (東京)

竹内由紀、石井剛志、中山 勉：リン脂質ポリマーを用いた水晶発振子マイクロバランス法の構築：ポリフェノールとリン脂質膜の相互作用解析への応用、第 72 回分析化学討論会、2012 年 5 月 19 日 (鹿児島)

〔図書〕(計 1 件)

石井剛志：「茶含有成分とタンパク質との相互作用」、茶の機能と科学、朝倉出版、p.107 (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

中山 勉 (NAKAYAMA TSUTOMU)
日本獣医生命科学大学・食品科学科・教授
研究者番号：50150199

望月 和樹 (MOCHIZUKI KAZUKI)
山梨大学・医学工学総合研究部・准教授
研究者番号：80423838