

平成 21 年 4 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18208012  
 研究課題名（和文） 緑茶カテキン受容体を介したカテキンの機能性発現とシグナリングの統合解析  
 研究課題名（英文） Integrated studies on signaling and physiological function of green tea catechin through the catechin receptor  
 研究代表者 立花 宏文（TACHIBANA HIROFUMI）  
 九州大学・大学院農学研究院・准教授  
 研究者番号：70236545

## 研究成果の概要（和文）：

緑茶カテキン(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) がその受容体 67LR に結合後の生理作用を仲介する細胞内シグナル伝達分子（緑茶カテキン感知分子）として、eEF1A および MYPT1 の同定に成功するとともに、これらの分子が *in vivo* における EGCG の抗がん作用発現に必須であることを明らかにした。また、緑茶カテキン受容体 67LR 分子中の EGCG 結合部位を同定した。EGCG の抗アレルギー作用や抗炎症作用も 67LR を介した作用であり、その分子機序を明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

67-kDa laminin receptor (67LR) has been identified as a cell surface receptor for green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) that mediates the anticancer activity of EGCG. Eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) and myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) have been identified as components responsible for the anticancer activity of EGCG *in vivo*. We identified functional motif on the extracellular domain of 67LR for exerting EGCG action. We also found that 67LR mediates anti-allergic and anti-inflammatory activities of EGCG, and clarified the molecular basis for the EGCG action through the receptor.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
総計	33,400,000	10,020,000	43,420,000

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：EGCG、緑茶、受容体、シグナリング、67LR、カテキン、機能性

## 1. 研究開始当初の背景

健康志向型食品（機能的食品もしくは特定保健用食品）の多くは、特定の機能的成分の量を単に増加させることでその機能的の効力を高めることを期待した設定となっているが、ある種の抗酸化ビタミンでは過剰摂取による重篤な弊害が指摘されている。こうした事例は、医薬品同様、食品成分の効き方が、個人間の遺伝学的素因の違いによる影響を受けることを示唆しているが、この効き方を決定する遺伝的背景は全く未解明である。増大の一途をたどる機能的食品を適切かつ安全に利用するためには、この遺伝的背景（機能的食品成分に対する感知遺伝子）の解明が急務である。機能的食品成分の効き方を決定する遺伝的背景は全く未解明であるが、その大きな原因は、機能的食品成分が直接作用する標的分子がほとんど明らかにされていなかった点にあった。茶 (*Camellia sinensis*) は、抗がん作用、抗アレルギー作用、血圧上昇抑制作用、動脈硬化抑制作用、脂質代謝改善作用、抗ウイルス作用などの多彩な生理作用が報告されるとともに、カテキン類を中心とする茶葉成分に関する研究が盛んである。茶カテキンの中でも(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) は他のカテキンと比較して強い生理活性を示すことから、その作用は特に注目されている。研究代表者はEGCGと特異的に結合し、その機能的性を担う細胞膜受容体があるとの独自のコンセプトのもと、緑茶カテキン受容体の同定に世界で初めて成功した（本成果は、成果を掲載した *Nature Struct. Mol. Biol.* の表紙を飾るとともに、プレス発表論文として全世界に発信された）。一方、本受容体分子に関する基礎的情報（発現組織や発現制御機構）は非常に乏しく、受容体分子としての具体的な働き（シグナル伝達機構）に関する研究は手つかずのままであった。また、食品成分受容体の同定はこれまでのところ、辛味成分カプサイシンやカラシ油成分アリルイソチオシアネートなどが明らかにされているにすぎず、機能的食品因子の標的分子に関する研究が加速されることが望まれる状況にあった。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、緑茶カテキン特有の生理作用は従来の抗酸化説だけでは説明不可能と考え、緑茶カテキンと特異的に結合し、その機能的性を担う受容体があるとの独自のコ

ンセプトのもと、緑茶カテキン受容体の同定に成功した。緑茶カテキンの抗ガン作用や抗アレルギー作用に対して応答を示さない細胞も、この受容体の発現を増加させると感受性を示すとともに、生理的な濃度（緑茶を数杯飲んだ後に血液中に現れる量）においても十分にその機能的性が発揮されることを明らかにした。逆にこの事実は、受容体分子の発現量が低い細胞や組織では緑茶カテキンの機能的性は発揮されにくいことを示している。一方、緑茶カテキンの抗ガン作用において、この受容体の量を低下させるとその効果が消失するだけでなく、逆に細胞増殖が促進されるケースがあることを種々のガン細胞において見いだしている。こうした結果は、緑茶カテキンの標的遺伝子がカテキンの効き方を決定する遺伝的素因の一つである可能性を示すとともに、標的分子の発現量が低い組織・細胞に対し、緑茶カテキン過剰摂取の弊害が惹起される危険性を示唆している。そこで本研究課題では、そもそも“なぜ緑茶カテキンは効くのか？”という命題に対して、機能的食品成分としてのカテキンを生体内シグナル因子として捉え、その生体内における感知メカニズムと機能的発現を統合的に理解することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究課題では、緑茶カテキンを生体内シグナル因子（受容体のリガンド）として捉え、受容体を介したカテキンの機能的発現機序を明らかにするとともに、緑茶カテキンを機能的素材として、安全かつ効果的に活用した食品を創製するための分子的基盤に資することを目的とし、以下の研究項目を遂行した。

(1) 緑茶カテキンが受容体67LRへの結合を介して発現を制御する遺伝子やタンパク質をDNAマイクロアレイなどの手法を用いて網羅的に解析する。

(2) 緑茶カテキンが受容体に結合した後どのようにしてその生理作用を発現するのか、その機能的発現に関与する因子を同定する（緑茶カテキン受容体を介したカテキンシグナリングの解明）。

(3) 多彩な緑茶カテキンの生理機能が緑茶カテキン受容体67LRを介した作用かどうかの検証を、RNA干渉法を用いた67LR特異的発現抑制などの手法を駆使して行う。

(4) 緑茶カテキン受容体67LR受容体分子中のカテキン結合領域の同定ならびにカテキンの結合様式を明らかにする。

(5) 緑茶カテキン受容体 67LR の発現を促進（もしくは阻害）する食品因子を明らかにする（緑茶カテキンの機能性を高めるための「食べ合わせ」の科学）。

#### 4. 研究成果

(1) 67LR を介した EGCG の細胞増殖抑制作用に関与する遺伝子を明らかにするため、EGCG に対する感受性の高いヒト肝がん細胞株 HepG2 と感受性の低いヒト肺がん細胞株 A549 を用い、67LR の発現を RNAi 法を用いて抑制した HepG2 細胞ならびに 67LR 発現遺伝子を導入し 67LR を過剰発現した A549 細胞をそれぞれ構築した。これらの細胞を EGCG で 12 時間処理後の遺伝子変動を DNA マイクロアレイ (Affymetrix 社 HG-U133A) を用いて解析し、それぞれのコントロール細胞における遺伝子変化と比較するとともに、これら二種類の細胞株の間で EGCG 処理により同方向の動き（例えば 67LR を高発現させた A549 細胞では EGCG 処理により発現が増加し、67LR の発現を抑制した HepG2 細胞では EGCG 処理により発現が増加しなかった遺伝子）をした遺伝子を集計した。その結果、67LR を介して EGCG が発現を増加させると推定される遺伝子が 135、逆に発現を低下させる遺伝子は 101 であった。これら遺伝子の中でがんとの関連が報告されている遺伝子を数種選択しさらに検証を行ったところ、いずれの遺伝子も腫瘍形成を抑制する方向に発現が変動することが示された。

(2) 67LR は緑茶カテキン EGCG を受け取り、EGCG のがん細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、抗アレルギー作用等の生理作用を仲介する細胞表面受容体分子として機能する。そこで次に、EGCG が 67LR に結合した後、どのようにその作用が伝達されるのか、67LR を介した EGCG のシグナル伝達に関与する細胞内因子の同定をフォワードジェネティクス的手法により試みた。その結果、eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) を EGCG の細胞増殖抑制作用に不可欠な遺伝子として見いだした。eEF1A を過剰発現させたところ、EGCG のがん細胞増殖抑制作用およびミオシン軽鎖のリン酸化レベル低下作用が亢進した。一方、これら EGCG の作用は RNA 干渉法による eEF1A 発現抑制により消失した。さらに、B16 細胞を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、コントロール B16 細胞を移植したマウスでは EGCG 経口投与により腫瘍の成長が阻害されたが、eEF1A の発現を抑制した B16 細胞の腫瘍成長は全く阻害されなかった。これらの結果より、eEF1A は EGCG の細胞増殖抑制作用を伝達する細胞内分子であることが示された。

EGCG による細胞増殖抑制作用ならびにヒ

スタミン放出阻害作用にミオシン軽鎖のリン酸化レベルの低下が関与していることから、そのリン酸化状態はミオシン軽鎖を基質とするキナーゼとフォスファターゼの両酵素により調節されている。そこで、ミオシンフォスファターゼの活性調節サブユニット MYPT1 の関与について検討した結果、EGCG はミオシンフォスファターゼ活性を負に調節する MYPT1 の Thr696 におけるリン酸化レベルを低下させること、また、MYPT1 の発現抑制により、EGCG による細胞増殖抑制作用やヒスタミン放出阻害作用が損なわれることを見いだした。さらに、EGCG 経口投与による B16 細胞の腫瘍成長抑制作用も MYPT1 の発現抑制により阻害された。これらの結果より、eEF1A および MYPT1 が EGCG の細胞増殖抑制作用を伝達する細胞内分子（緑茶カテキン感受性遺伝子）であることが示され、67LR から MYPT1 の活性化につながるシグナル伝達経路（緑茶カテキン受容体シグナリング）の存在が明らかになった（図 1）。

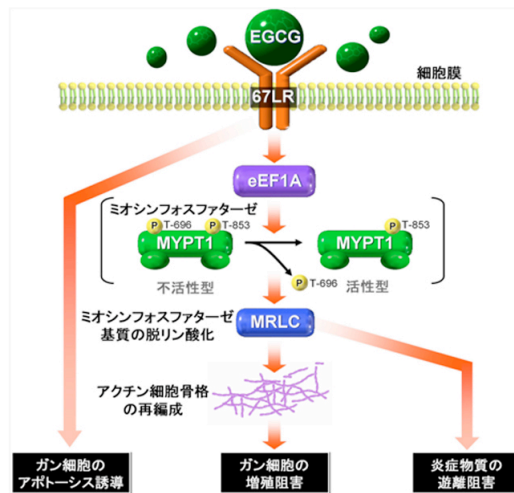


図 1 緑茶カテキン受容体を介した EGCG シグナリング経路

#### (3) 緑茶カテキン受容体を介した EGCG の抗がん作用

EGCG はヒト子宮頸がん細胞株 HeLa に対しストレスファイバーを消失させるとともに、ストレスファイバーの形成に重要なミオシン軽鎖のリン酸化レベルを低下させた。また、細胞分裂期に形成されるミオシン軽鎖依存性の収縮環の形成も阻害した。これらの結果より、EGCG はミオシン軽鎖のリン酸化レベルを低下させることでストレスファイバーの形成や細胞分裂時の収縮環形成を阻害し、細胞周期を遅延させることが示唆された。こうした EGCG の作用における 67LR の関与を検討するため、67LR の発現を RNA 干渉法によりノックダウンしたところ、細胞増殖抑制作用およびミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作

用はともに阻害された。同様の結果が、生理的濃度の EGCG で増殖が抑制されるヒト結腸がん細胞株 Caco-2 においても観察された。以上の結果から、67LR を介したミオシン軽鎖のリン酸化レベルの低下作用がもたらすストレスファイバーの消失や収縮環形成阻害が、EGCG の細胞増殖抑制作用の一因であることが示された。

### 緑茶カテキン受容体を介したカテキンの抗アレルギー作用

EGCG がヒト好塩基球細胞株に対しヒスタミン放出阻害作用を示すとともに、ミオシン軽鎖のリン酸化を低下させることを見出した。ミオシン軽鎖のリン酸化レベルは細胞の脱顆粒強度と相関を示し、ミオシン軽鎖のリン酸化を阻害すると脱顆粒が抑制される。そこで、EGCG のヒスタミン放出阻害作用およびミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作用における 67LR の関与を RNA 干渉法により検討したところ、67LR をノックダウンしたヒト好塩基球細胞株では、EGCG のヒスタミン放出抑制作用およびミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作用のいずれも阻害された。以上の結果より、EGCG は 67LR を介してミオシン軽鎖のリン酸化を阻害し、ヒスタミン放出を阻害することが示された(図 2)。(−)-epigallocatechin-3-*O* (−3-*O*-methyl) gallate (メチル化カテキン) は抗アレルギー作用を示す茶葉中から発見された成分であり、メチル化カテキンを豊富に含む“べにふうき緑茶”の花粉症患者に対する試験では有意な症状の緩和効果が示されている。そこでこうしたメチル化カテキンの作用における 67LR の関与を検討した結果、67LR 発現のノックダウンにより、細胞表面結合性およびヒスタミン放出阻害作用のいずれもが抑制され、EGCG と同様、メチル化カテキンの抗アレルギー作用に 67LR が関与していることが示された。

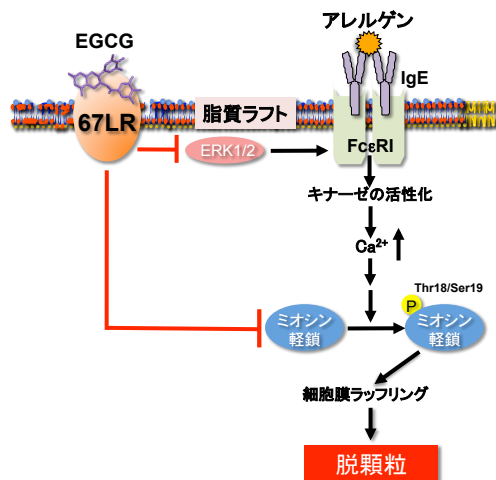


図 2 67LR を介した EGCG の脱顆粒阻害機序

### 緑茶カテキン受容体を介したカテキンの抗炎症作用

EGCG は生理的低濃度 (1 μmol/L) において、LPS によって誘導される腹腔マクロファージからの TNF-α、インターロイキン 6、一酸化窒素といった炎症メディエーターの産生を阻害した。そこで 67LR の関与について検討したところ、EGCG による炎症メディエーターの産生阻害作用は、腹腔マクロファージを抗 67LR 抗体で処理することやマクロファージ細胞株 RAW264.7 における 67LR の発現を RNA 干渉法にてノックダウンすることにより消失した。また、DNA マイクロアレイを用いた解析から、LPS 誘導性の炎症関連遺伝子の内、21 種の遺伝子発現の誘導が EGCG によって抑制されたが、67LR 発現をノックダウンした細胞では 21 種全ての遺伝子の発現抑制作用が観察されなかった。以上より、EGCG は 67LR を介して炎症メディエーターの産生を阻害することが明らかになった。LPS による炎症メディエーター産生は LPS 受容体 TLR4 を介したシグナル伝達経路を経て誘導される。そこで 67LR を介した EGCG の TLR4 シグナリング阻害について検討したところ、EGCG は LPS 誘導性の NFκB 経路および MAP キナーゼ経路を阻害すること、さらに、TLR4 の発現を転写レベルにおいて抑制することを見出した。

(4) 受容体分子中の EGCG 結合部位が 161-170 番目のアミノ酸残基からなるドメイン (IPCNNKGAHS) であることを、結合ドメイン欠損体を用いた検討等より明らかにした。

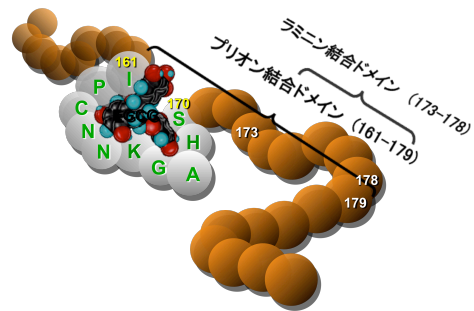


図 3 67LR の EGCG 結合部位

(5) 67LR の発現を増大させる食品成分として all-*trans*-retinoic acid (ATRA) を見いだした。また、この発現増強作用が核内受容体 RAR を介した作用であることを明らかにした。さらに、マウスメラノーマ細胞株 B16 細胞を移植した C57BL/6N 腫瘍モデルマウスにおいて、EGCG と ATRA の同時摂食における抗腫瘍作用について検討したところ、EGCG+ATRA 群においてのみ腫瘍成長の有意な抑制が観察された。また、腫瘍組織において ATRA 群および EGCG+ATRA 群における 67LR 発現レベルの上昇がみられた。以上の結果より、*in vivo*

において ATRA により 67LR の発現を増強させることで、EGCG の機能性増強が可能であることが示唆された。

#### 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 33 件)

- ① Byun, E.H., Fujimura, Y., Yamada, K., Tachibana, H., TLR 4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin 3 gallate through 67-kDa laminin receptor, *J. Immunol.*, in press, 査読有.
- ② Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., Tachibana, H., Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor, *J. Biol. Chem.*, 283, 3050-3058, 2008, 査読有.
- ③ Fujimura, Y., Umeda, D., Yamada, K., Tachibana, H., The impact of the 67 kDa laminin receptor on both cell-surface binding and anti-allergic action of tea catechins, *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 133-138, 2008, 査読有.
- ④ Fujimura, Y., Umeda, D., Yano, S., Maeda-Yamamoto, M., Yamada, K., Tachibana, H., The 67kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of O-methylated EGCG, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 364, 79-85, 2007, 査読有.

[学会発表] (88 件)

- ① 立花宏文、緑茶カテキンのケミカルバイオロジー、日本カテキン学会基調講演、2009 年 9 月 9 日、名古屋国際会議場
- ② 立花宏文、緑茶カテキンの標的分子研究からみえてきたこと、日本農芸化学会大会シンポジウム、2009 年 3 月 28 日、福岡国際会議場
- ③ 立花宏文、緑茶カテキン受容体 67LR を介したカテキンの機能性発現機構、第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 17 日、パシフィコ横浜
- ④ Tachibana, H., Green tea polyphenol EGCG signaling through the 67kDa laminin receptor, 3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health, 2007 年 11 月 28 日, 国立京都国際会館.

[図書] (計 8 件)

- ① 立花宏文 (小川正、河田照雄、寺尾純二編集)、緑茶カテキン受容体を介した EGCG の機能性発現とシグナリング、栄養学研究の最前線、pp93-107, 2008
- ② Tachibana, H., (Yoshikawa, T. ed.) Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG, *Food Factors for Health Promotion, Forum Nutr. Vol. 61*, 156-169, 2009
- ③ 立花宏文 (食品機能性の科学編集委員会編集)、茶カテキン、食品機能性の科学、pp323-327, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: エピガロカテキンガレート誘導体及びそれを含む医薬組成物

発明者: 立花宏文、高橋孝志、田中浩二

権利者: 国立大学法人九州大学、国立大学法人東京工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-028974

出願年月日: 2010 年 2 月 12 日

国内外の別: 国内

名称: ガロイルカテキン類の抗酸化活性の促進方法

発明者: 立花宏文

権利者: 国立大学法人九州大学

種類: 特許

番号: 特願 2008-332205

出願年月日: 2008 年 12 月 26 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

立花 宏文 (TACHIBANA HIROFUMI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 70236545

##### (2) 研究分担者

藤村 由紀 (FUJIMURA YOSHINORI)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・准教授

研究者番号: 20390304