

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780101
 研究課題名（和文）茶カテキン結合蛋白質のプロテオーム解析による生理作用発現機構の解明
 研究課題名（英文）Proteomic analysis of tea catechin-binding proteins

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

研究成果の概要：緑茶は、生活習慣病の予防に効果を発揮することが期待されているが、機能性の発現機構は解明されておらず、化学的根拠は得られていない。最近、多くの蛋白質が生体内・外に存在する低分子化合物と相互作用し、生体機能を調節することが明らかとなった。本研究では、緑茶の主要な機能性成分であるカテキン類と結合し生体機能調節に関与する蛋白質を探索する為の方法論を確立し、血清あるいは細胞内で結合する複数の蛋白質を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

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：食品生化学

1. 研究開始当初の背景

緑茶に含まれるカテキン類は、抗酸化作用や抗炎症作用、抗肥満作用など様々な生理機能を有しており、ガンや動脈硬化などの生活習慣病のリスク低下に効果を発揮することが期待されている。カテキン類の生理機能は、一般に非常に強い抗酸化活性が担っていると考えられているが、作用機構に関しては十分な解明がなされていない。

カテキン類は、プロテアソームやマトリックスメタロプロテアーゼを不可逆的に阻害することで抗ガン作用を示すほか、酸化ストレスの関与しない様々なシグナル伝達の調

節因子として働くことで、生理作用を示すことが報告されている。そのため、カテキン類の生理作用発現機構を理解するためには、抗酸化活性では説明できない新たな作用機序の解明が必要である。

カテキン類と蛋白質との結合による複合体の形成は古くから知られている。カテキン類の舌や口腔粘膜のペプチドや蛋白質との結合による変性作用は、苦渋味を呈し、緑茶においてはその味覚を決める重要な現象のひとつである。また、カテキン類は食品中の蛋白質とも強く結合するため、食品科学分野においては嗜好性だけでなく、調理、製造、

加工あるいは食品の機能性の損失の観点からも重要な現象である。このように、カテキン類と蛋白質との相互作用は一般に広く認識されているにも関わらず、カテキン類の示す生理作用の観点からはこれまであまり研究が進んでいなかった。

近年、ガン細胞の増殖抑制に関与するカテキン結合分子として 67-kDa ラミニンレセプターが報告され、カテキン類と蛋白質の相互作用の重要性が明らかとなった。しかしながら、カテキン類と結合する蛋白質の探索はほとんど行われておらず、結合による蛋白質の機能変化を構造化学的に証明した研究例は少なかった。

2. 研究の目的

カテキン類と結合する蛋白質をプロテオーム解析により決定し、カテキン類と蛋白質の結合反応や蛋白質構造変化を化学的に解析することで蛋白質の機能変化を明らかにし、カテキン類の様々な生理機能の作用機序を解明することを目的とした。

この目的を達成するために、カテキン類と結合した蛋白質を分析する新しい方法の開発を当初の目標とし、これを利用した分子標的の決定をその後の目標とした。

3. 研究の方法

(1) カテキン類と結合した蛋白質の検出、精製及び構造解析を行うための方法論の開発を行った。モデル蛋白質としてヒト血清アルブミン、モデルペプチドとして CAMKII (ペプチド配列: MHRQETVDC) を用いた。

①カテキン類と蛋白質との結合を簡便に検出する方法として、レドックスサイクリング染色法(電気泳動後に PVDF 膜に転写し、膜上でニトロブルーテトラゾリウム還元による紫色の沈殿を利用した染色法)の利用を試みた。

②カテキン類が結合した蛋白質を精製する方法として、ホウ酸結合ビーズ(塩基性条件下でカテコール構造と結合し、酸性条件下で外れるビーズを利用)の利用を試みた。

③カテキン類と蛋白質との結合構造を解析する方法として、質量分析法(MS: カテ蛋白質との結合による質量増加および MS/MS を利用した結合部位の特定)の利用を試みた。

(2) 緑茶に含まれる主要なカテキン類としては、エピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg)、エピガロカテキンガレート (EGCg) を使用した(図 1)。構築した手法を利用し、ヒトガン細胞系においてカテキン類標的蛋白質の探索を行った。探索法としては、二次元電気泳

動法と MS を利用したプロテオミクスにより行った。さらに、標的となる蛋白質をモデル蛋白質として利用し、結合様式、結合部位、結合に関与する条件を解析するために質量分析と種々の生化学的手法を用いて解析した。特にカテキン類の酸化安定性が蛋白質との結合に与える影響を評価した。

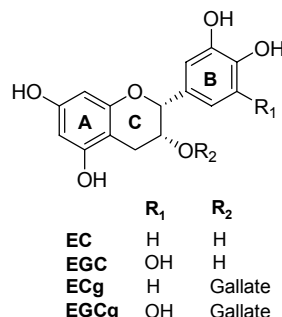


図1 カテキン類の化学構造

4. 研究成果

(1) はじめに、EGCg とヒト血清アルブミンとをインキュベートした試料を用いて、レドックスサイクリング染色の条件検討を行い、カテキン類と蛋白質との結合を検出する方法を確立した(図 2)。これによりカテキン類が結合した蛋白質を電気泳動で分離した後に、青紫色の染色強度で結合の強弱を評価することが可能となった。

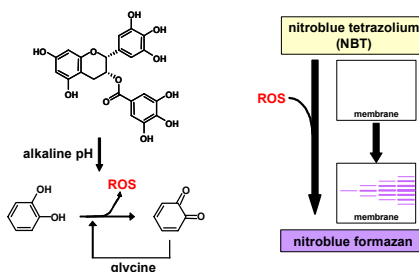


図2 レドックスサイクリング染色によるカテキン結合蛋白質の検出

次に、ホウ酸結合ビーズを用いて条件検討を行い、EGCg が結合した蛋白質の精製法を構築した(図 3)。

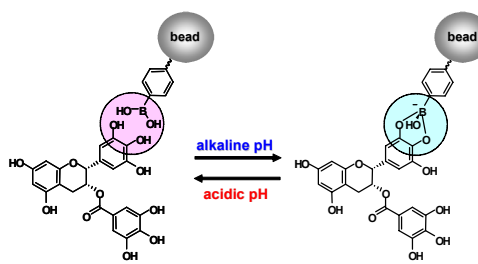


図3 ホウ酸結合ビーズによるカテキン結合蛋白質の精製

前記したレドックスサイクリング染色は、カテキン類との結合を簡便に評価することができるが、カテキン類が結合していない蛋白質と結合した蛋白質を分離できないため、二次元電気泳動による分離能を相当に高めない限り、MSによる同定された蛋白質が必ずしもカテキンと結合した蛋白質であるとはいえない。本精製法の構築によりカテキン類結合蛋白質のプロテオーム解析が可能となった。

さらに、EGCg と CAMKII とをインキュベートした試料を用い MS による結合構造の解析を行った。その結果、EGCg の結合による質量増加は EGCg の質量 458-Da よりも 2-Da 小さい 456-Da であること、この結合は有機溶媒や強酸性条件下でも解離しないことが明らかとなった。また、結合部位はシステイン残基であることが明らかとなった。これらの結果より、EGCg と CAMKII との結合様式は共有結合であり、蛋白質中のシステイン残基が共有結合の標的となることが示唆された (図 4)。

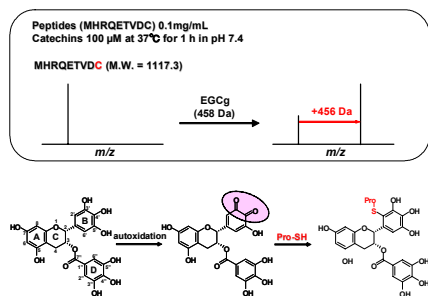


図4 質量分析によるカテキン結合構造の決定

これらの方法論の確立により、カテキン類と結合する蛋白質の検出、分離、同定、構造決定が可能となった。

(2) はじめに、構築した方法論を用い、ヒト胃ガン細胞 AZ521 に 4 種のカテキン類を投与し、レドックスサイクリング染色法により細胞内蛋白質への結合を評価した。その結果、結合性は EGCg が最も高く、次いで ECg が高かった。ガロイル基を有していない EGC や EC と細胞蛋白質との結合は殆ど検出されなかった。これは、ガロイル基を有していないカテキン類の細胞膜への親和性が低く、細胞内に取り込まれ難いためだと考えられた。EGCg と細胞蛋白質との結合は他のヒトガン細胞にも認められ、結合は投与濃度に依存的であり、投与 3 時間で最も多くの結合が認められた。

次に、EGC と結合する蛋白質を同定するために、レドックスサイクリング染色により最も多くの結合が認められた条件において、ホウ酸結合ビーズによる精製を行った。精製した蛋白質を二次元電気泳動により分離し、銀

染色により検出した。さらに検出した蛋白質をトリプシン消化し MS により同定した結果、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) やグルタチオン S-トランスフェラーゼ P1-1 (GSTP1) が、EGCg と結合する蛋白質であることが明らかとなった (図 5)

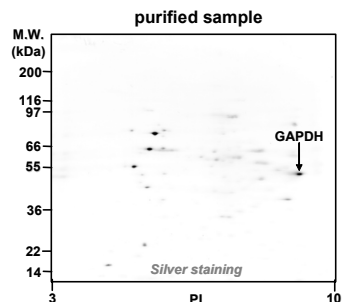


図5 EGCgが結合する細胞内蛋白質の精製と同定

そこで、GAPDH をモデル蛋白質として用い、EGCg の結合による酵素活性の変化や結合部位及び結合構造の解析を行った。その結果、GAPDH の酵素活性は EGCg の結合量の増加に伴い低下することが明らかとなった。MS による解析の結果、EGCg は活性中心のシステイン残基や酵素活性制御に関与する分子表面のシステイン残基と共有結合することが明らかとなった。したがって、EGCg による GAPDH の酵素活性の低下は、活性制御に関与するシステイン残基との共有結合により引き起こされることが示唆された。

EGCg とシステイン残基との共有結合には EGCg の B 環の酸化によるキノン構造の形成が必須である。したがって、EGCg と蛋白質との結合には EGCg の酸化安定性が重要であると予想した。そこで、カテキン類の酸化安定性が GAPDH のシステイン残基との反応性に及ぼす影響を評価した。中性の水溶液中での 4 種のカテキンの酸化安定性は EGCg > EGC >> ECg > EC である。GAPDH のシステインとの反応性も EGCg と EGC が ECg や EC よりも高く酸化安定性の結果と一致した。また、カテキン類は pH がアルカリ性になるほど酸化安定性は低くなるが、pH が高くなるほど反応性は高まった (図 6)。さらに、GAPDH のシステイン残基との反応性はビタミン C やグルタチオンなどの抗酸化剤存在下では低く、ラッカーゼや過酸化水素など酸化を促進するものの存在下では高くなった。

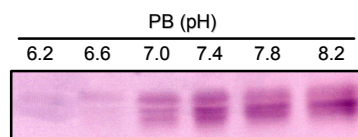


図6 EGCgとGAPDHとの反応性に及ぼすpHの影響

以上の結果より、カテキン類と蛋白質システイン残基との反応性は、カテキン類の酸化安定性に強く影響されることが明らかとなった。また、システイン残基との共有結合反応は GSTP1 においても認められ、GAPDH と同様にカテキン類の酸化安定性が反応性に強く影響した。

本研究により、カテキン類と結合し生体機能調節に関与する蛋白質を探索する為の新しい方法論を確立し、これを利用して複数の蛋白質を同定することに成功した。また、蛋白質との結合様式にシステイン残基との共有結合を見出し、この結合反応がカテキン類の酸化安定性に影響されることを明らかとした。生体内は酸素分圧が低く、また細胞内はグルタチオンなどの抗酸化物質の存在により還元状態に保たれている。しかし酸化ストレスの亢進により活性酸素種が生成すると細胞内は酸化状態に偏ることが知られている。カテキン類は抗酸化性を有しており、細胞内で活性酸素を消去し、自身が酸化される。すなわち、EGCg は酸化ストレスにおいては生体内の蛋白質システイン残基と結合する可能性がある。蛋白質のシステイン残基はシグナル伝達制御の最重要因子のひとつである。EGCg とシステイン残基との結合は、蛋白質機能ひいては細胞機能を制御する可能性がある。一般にカテキン類の示す生理作用は抗酸化活性によるものが多いと考えられているが、本研究結果より、蛋白質システイン残基との共有結合により酸化ストレスから生体を防御するシグナルを伝達し、これがカテキン類の示す生理作用を発現することが予想された。今後、更なる標的蛋白質を明らかにし、その結合構造や機能変化を解析することで、茶の機能性に化学的根拠を与えることが期待される。

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 2 件)

- ① Bae, M.J., Ishii, T., Minoda, K., Kawada, Y., Ichikawa, T., Mori, T., Kamihira, M., Nakayama, T.: Albumin stabilizes (-)-epigallocatechin gallate in human serum: binding capacity and antioxidant property. *Molecular Nutrition and Food Research*, in press (2009) 査読有
- ② Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Nakayama, T., Akagawa, M.: Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate

through autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, 45, 1384-1394, (2008) 査読有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 熊澤茂則、石井剛志、中山 勉：食品の品質評価および機能解析におけるプロテオミクスの応用、日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 27 日 (福岡)
- ② 蓑田香奈子、石井剛志、市川達也、鈴木友紀子、菅 敏幸、中山 勉：血清アルブミンによるエピガロカテキンガレート の酸化抑制機構の解明、日本農芸化学会 中部支部第 154 回例会 若手シンポジウム、2008 年 11 月 29 日 (岐阜)
- ③ 森 大気、石井剛志、田中智子、赤川 貢、中山 勉：(-)-Epigallocatechin gallate と glutathion-S-transferase P1-1 との共有結合反応、第 13 回日本フードファクター学会、2008 年 11 月 17 日 (東京)
- ④ 田中智子、石井剛志、水野大輔、森 大気、熊澤茂則、中山 勉、赤川 貢：培養細胞系における epigallocatechin-3-gallate 結合タンパク質の解析、第 13 回日本フードファクター学会、2008 年 11 月 17 日 (東京)
- ⑤ 蓑田香奈子、石井剛志、市川達也、河田裕希子、ベ・ミンジョン、植草義徳、古田 巧、菅 敏幸、鈴木友紀子、中山 勉：血清アルブミンとの相互作用によるカテキン類の酸化抑制、第 13 回日本フードファクター学会、2008 年 11 月 17 日 (東京)
- ⑥ 森 大気、石井剛志、赤川 貢、中山 勉：蛋白質システイン残基との共有結合反応に関与するカテキン類の酸化特性、第 153 回日本農芸化学会中部支部例会、2008 年 11 月 1 日 (愛知)
- ⑦ 蓑田香奈子、石井剛志、河田裕希子、市川達也、鈴木友紀子、中山 勉：血清アルブミンはガロイル基を有するカテキン類の酸化安定性を向上させる、第 153 回日本農芸化学会中部支部例会、2008 年 11 月 1 日 (愛知)
- ⑧ 蓑田香奈子、石井剛志、鈴木友紀子、中山 勉：血清アルブミンとの親和性に関与するカテキン類の構造特性、第 55 回日本食品科学工学会大会、2008 年 9 月 6 日 (京都)
- ⑨ 石井剛志、カテキン類と蛋白質との相互作用：分析法の構築とその応用、第 5 回日本カテキン学会、2008 年 8 月 22 日 (東京)
- ⑩ 森 大気、石井剛志、赤川 貢、中山勉：カテキン類の酸化安定性と蛋白質システイン残基との反応性、第 61 回日本酸

- 化ストレス学会、2008年6月20日(京都)
- ⑪ Mori, T. Ishii, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Kumazawa, S., Miyoshi, N., Akagawa, M., Nakayama, T. : Regulation of thiol enzyme activity by (-)-epigallocatechin gallate through covalent binding to cysteine, 2008ASBMB Annual Meeting, 2008年4月8日 (San Diego, CA, USA)
- ⑫ 蓑田香奈子、石井剛志、ベ・ミンジョン、河田裕希子、鈴木友紀子、中山 勉：カテキン類と血清アルブミンとの相互作用、日本農芸化学会 2008 年度大会、2008 年 3 月 28 日 (愛知)
- ⑬ Mori, T., Ishii, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Kumazawa, S., Yamaji, R., Akagawa, M., Nakayama, T. : (-)-Epigallocatechin gallate regulates thiol enzyme activity by covalent binding to cysteine residues, 3rd International Conference on Polyphenols and Health, 2007 年 11 月 27 日 (京都)
- ⑭ Tanaka, T., Mizuno, D., Ishii, T., Mori, T., Yamaji, R., Kumazawa, S., Nakayama, T., Akagawa, M. : Proteomic identification of epigallocatechin-3-gallate-binding protein in AZ521 human gastric cancer cells, 3rd International Conference on Polyphenols and Health, 2007 年 11 月 27 日 (京都)
- ⑮ Ishii, T., Bae, MJ., Kawada, Y., Nakayama, T. : Effects of human serum albumin on stability of (-)-epigallocatechin-gallate, 3rd International Conference on Polyphenols and Health, 2007 年 11 月 27 日 (京都)
- ⑯ 石井剛志、カテキン類の安定性と蛋白質との反応性、第 4 回日本農芸化学会中部支部会 若手シンポジウム、2007 年 11 月 17 日 (静岡)
- ⑰ 石井剛志、ベ・ミンジョン、河田裕希子、中山 勉：血清アルブミンによるEGCgの安定化、日本食品科学工学会第 54 回大会、2007 年 9 月 8 日 (福岡)
- ⑱ 石井剛志、カテキン類とタンパク質との相互作用、第 4 回日本カテキン学会、2007 年 8 月 24 日 (静岡)
- ⑲ 森 大気、石井剛志、熊澤茂則、赤川 貢、中山 勉：食品因子の機能解明に向けたプロテオーム解析、日本ヒトプロテオーム機構 (JHUP) 第 5 回大会、2007 年 7 月 30 日 (東京)
- ⑳ 森 大気、石井剛志、赤川 貢、水野大輔、

田中智子、熊澤茂則、中山 勉：質量分析法を用いた茶カテキン類結合蛋白質の解析、第 55 回日本質量分析総合討論会、2007 年 5 月 17 日 (広島)

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