

平成22年 4月13日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780101  
 研究課題名（和文） 食品ポリフェノールの酸化付加反応による蛋白質の修飾と生理作用  
 発現機構の解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of biofunctional expression mechanism of food polyphenols  
 by oxidative modification of protein  
 研究代表者  
 赤川 貢 (AKAGAWA MITSUGU)  
 大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教  
 研究者番号：70405356

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞内の蛋白質へ酸化付加反応を介して共有結合する食品ポリフェノールを評価・探索するとともにその標的蛋白質の同定を行った。さらに、ポリフェノールの結合によってもたらされる標的蛋白質の機能変化と細胞応答を並行して解析することによって、ポリフェノールの多様な生理機能の発現機構を解明することを試みた。その結果、主要な緑茶ポリフェノールである epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の標的蛋白質を同定し、その抗癌作用への関与を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）： In the present study, we searched for polyphenols that covalently bind to cellular proteins. A major green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), was identified to bind to cellular proteins with high affinity. The regulation mechanism of protein function by the binding of EGCG was examined. We also identified cellular protein targets of EGCG in several functional categories including energy metabolism, glycolysis, chaperone, and RNA processing. The binding of EGCG to the target protein was suggested to be closely involved in anti-cancer effect of EGCG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：ポリフェノール、カテキン、緑茶、ガン、蛋白質、p68

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ポリフェノールが、抗癌作用、抗アレルギー作用、血圧上昇抑制作用、抗動脈硬化作用などの様々な生理作用を持つことが

報告され、ポリフェノールの摂取による癌や循環器疾患などの生活習慣病の予防効果に大きな期待が寄せられている。ポリフェノールの摂取による健康増進効果は、その強い抗

酸化活性の解明によりひとつの化学的根拠が与えられた一方で、多くの研究が進む過程で抗酸化活性だけでは説明できない様々な生理作用も報告されてきている。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞膜上や細胞内の蛋白質システイン残基へ酸化付加反応を介して共有結合する食品ポリフェノールを評価・探索するとともにその標的蛋白質の同定を目的とした。さらに、ポリフェノールの結合によってもたらされる標的蛋白質の機能変化と細胞応答を並行して解析することによって、ポリフェノールの多様な生理機能の発現機構を解明することを試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞蛋白質に結合する機能性食品ポリフェノールの評価・探索

代表的な食品ポリフェノールをヒト培養細胞に投与し、細胞蛋白質への結合を評価した。また、得られた知見からそれぞれのポリフェノールの反応性と構造の相関を解析した。

### (2) ポリフェノールとモデル蛋白質の化学的解析

結合能が認められたポリフェノールとモデル蛋白質を反応させ、蛋白質機能へ与える影響を評価した。さらに、詳細な構造化学的解析を行いその結合部位と構造を決定し、細胞蛋白質の機能変化との相関を調べた。

### (3) フォーカスドプロテオミクスによるポリフェノール標的蛋白質の解析

細胞培養系においてポリフェノールが結合する標的蛋白質を網羅的に同定し、機能解析を行うことでポリフェノールが発現する生理作用の作用機序の解明に着手した。研究代表者らは、既にカテコールとフェニルボロネイトアガロース (PBA) ゲルの親和性を利用することによって特異的にカテキン付加蛋白質をアフィニティ分離する技術の開発に成功している。本研究では、この技術をフォーカスドプロテオミクスに応用することでポリフェノール標的蛋白質の同定を行った。

### (4) ポリフェノールの蛋白質への結合によって誘導される細胞応答の解析

ポリフェノール標的蛋白質の機能解析から得られた情報をもとに、推定される細胞応答を解析しポリフェノールの生理作用発現メカニズムの解明を蛋白質側から試みる。また、特に癌細胞を用いることによって抗癌作用への関与を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 本研究では、緑茶の主成分であるポリフェノール、(-)-epigallocatechin-3-gallate

(EGCG) が他のポリフェノールと比較して非常に強い蛋白質結合能を持つことを明らかにした。以下、本研究成果の概略を記す。

(2) 緑茶カテキンは、抗癌作用、血圧上昇抑制作用、血中コレステロール調節作用、血糖値調節作用、老化抑制作用、抗アレルギー作用などの多彩な生理機能性を有することが知られている。これらの機能性は、主に緑茶カテキンの非常に強い抗酸化活性によってもたらされると考えられていたが、最近になって、緑茶カテキンとタンパク質などの生体分子との相互作用が、機能性発現の重要な分子機構の一つであることが明らかにされつつある。主要な緑茶カテキンであり最も強い活性を有する EGCG の標的タンパク質として vimentin、GRP78、および 67 kDa ラミニンレセプターなどが同定されており、それらのタンパク質への結合が機能性の発現に関与しているという報告がなされている。しかしながら、その作用機序や結合機構は十分には解明されていない。我々は、EGCG の自動酸化によって生成する EGCG キノンが、タンパク質のシステイン残基のチオール基に求電子的に共有結合すること、さらに、その結合によってタンパク質機能を制御していることを見出している (図 1)。タンパク質中のシステイン残基は、多様な酵素の活性中心として機能するほか、酸化還元反応を介してシグナル伝達のスイッチとして作動することで生体機能を調節している。したがって、緑茶カテキンが持つ多様な生理機能性の発現には、EGCG のシステイン残基への共有結合が関与している可能性が考えられる。

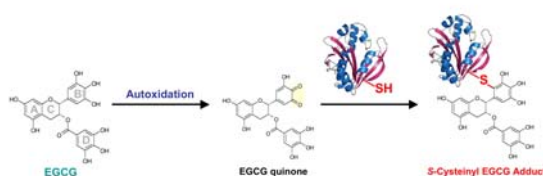


図 1 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の自動酸化を介した蛋白質への共有結合

(3) 本研究では、培養細胞において EGCG が共有結合する細胞内標的タンパク質を同定し、EGCG の結合によってもたらされる標的タンパク質の機能変化を解析することによって、緑茶カテキンのもつ生理機能性の発現機構を解明することを目的とした。

(4) ヒト胃癌細胞株 AZ521 細胞に EGCG を投与し、抽出した細胞タンパク質を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写し、カテコール基を特異的に検出する redox-cycling 染色を行って、EGCG 結合タンパク質を検出した。その結果、EGCG 濃度依存的に陽性バンドが複数検出されたことから、EGCG が細胞内タンパク

質に結合することが明らかになった。また、カテコール基に親和性をもつ *m*-aminophenylboronic acid (PBA) ビーズを用いて pull-down 法による EGCG 結合タンパク質の分離を行い、SDS-PAGE によって分離後、銀染色および redox-cycling 染色を行った。その結果、EGCG 濃度依存的に陽性バンドの増加が観察されたため、PBA ビーズによる EGCG 結合タンパク質の精製法を確立することができた。EGCG の標的タンパク質を同定するため、PBA ビーズによる精製後、二次元電気泳動を行い、PMF 法による解析を行った。その結果、vimentin や GRP78 など、すでに EGCG と相互作用することが報告されているタンパク質を含む 12 のタンパク質の同定に成功した。本研究では、同定した標的タンパク質の中で、p68 に着目した。p68 は DEAD box RNA helicase ファミリーの一員であり、RNA スプライシング、翻訳、およびリボソームの発生などの RNA 代謝において機能し、個体の成長や発達に重要な役割を果たしている。最近になって p68 は、癌細胞において過剰に発現しており、*c-myc* や *cyclin D1* などの癌関連遺伝子の転写活性化を誘導する  $\beta$ -catenin のコアクチベーターとして機能し、癌の発生と進展に密接に関与していることが明らかになり、癌治療における抗癌剤の新しい分子標的として注目されている。したがって、EGCG の p68 への結合が緑茶カテキンの抗癌作用の発現に関与している可能性が考えられた。

(5) EGCG の投与によって AZ521 細胞の増殖阻害が観察されたため、EGCG が発現する抗癌作用への p68 の関与を検証した。EGCG の投与によって p68 のリン酸化レベルや  $\beta$ -catenin との複合体形成には影響が認められなかったが、細胞質と核内の p68 と  $\beta$ -catenin のタンパク質レベルの顕著な減少が観察された。さらに、 $\beta$ -catenin の標的癌遺伝子産物である *c-myc* と *cyclin D1* の発現レベルが減少することも明らかになった。次いで、EGCG が p68 タンパク質レベルの減少を誘導するメカニズムを検証した。タンパク質合成阻害剤である CHX の投与は、p68 レベルに影響を与えなかったが、CHX と EGCG の同時投与は、経時的に p68 レベルを減少させた。さらに、プロテアソーム阻害剤である MG-132 処理によって EGCG が誘導する p68 レベルの減少が阻害されたことから、EGCG はプロテアソームを介した p68 の分解を促進することが明らかになった。以上の結果から、EGCG は p68 に結合することによってプロテアソームを介した p68 の分解を誘導して、 $\beta$ -catenin の標的癌遺伝子の転写を抑制し、癌細胞の増殖を阻害するという抗癌作用発現機構が考えられた (図 1)。

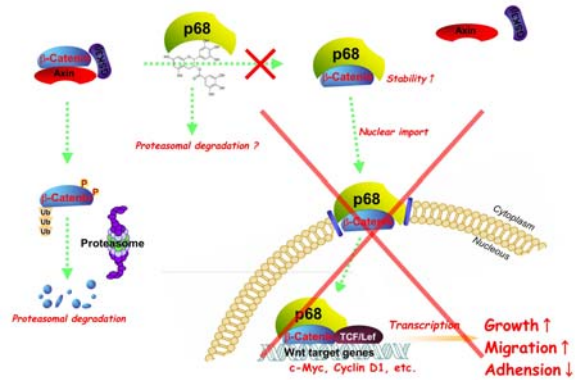


図 1 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の自動酸化を介した蛋白質への共有結合

## 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 8 件)

- ① Akagawa, M., Suyama, K., and Uchida, K. Fluorescent detection of  $\alpha$ -aminoaldehydes and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in oxidized proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 2009 Mar 15;46(6):701-706. 査読有り
- ② Ishii, T., Ishikawa, M., Miyoshi, N., Yasunaga, M., Akagawa, M., Uchida, K., and Nakamura, Y. Catechol-type polyphenol is a potential modifier of protein sulfhydryls: Development and application of a new probe for understanding the dietary polyphenol actions. *Chem. Res. Toxicol.* 2009 Oct; 22(10):1689-1698. 査読有り
- ③ Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Akagawa, M. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autooxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 2008 Nov 15;45(10): 1384-1394. 査読有り

[学会発表] (計 18 件)

- ① 森 大気、石井剛志、赤川 貢、中村宜督、中山 勉: カテキン類とグルタチオン-S-転移酵素P1-1 との共有結合反応. 第 82 回日本生化学会大会 (神戸)、2009 年 10 月 22 日
- ② 田中 智子、前田 智裕、木村 一城、久保 嘉輝、石井 剛志、赤川 貢 Epigallocatechin-3-gallate の上皮成長因子受容体への結合による癌細胞の増殖抑制機構 第 6 回日本カテキン学会 2009 年 9 月 9 日 (名古屋)
- ③ 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)

- ④ 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 日本酸化ストレス学会  
学術集会 (京都) 2008年6月20日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤川 貢 (AKAGAWA MITSUGU)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：70405356

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

石井 剛志 (ISHII TAKESHI)

静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科・  
助教

研究者番号：50448700