

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580148

研究課題名（和文）茶カテキン類と生体成分の分子間相互作用に関する化学生物学的解明

研究課題名（英文）Chemical biology of molecular interaction between tea catechins 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（和文）：

茶カテキン類とタンパク質あるいはリン脂質との分子間相互作用を解析し、以下のような成果を得た。

1. 水晶発振子マイクロバランス法により、ガレート型カテキン類のヒト血清アルブミン（HSA）に対する親和性が、非ガレート型カテキン類に比べて 100 倍以上強いことを見出した。
2. HSA は酸化したカテキン類と反応すると、カルボニルが生成することを見出した。
3. ^{13}C でラベルされた ECg を合成し、 ^{13}C - ^{31}P rotational echo double resonance 測定法により、ECg のカルボニル炭素とリン脂質のリン原子との距離が $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

1. The association constants obtained from the frequency changes of quartz-crystal microbalance (QCM) revealed interactions of ECg and EGCg with HSA that are 100 times stronger than those of EC and EGC.
2. The most important structural element contributing to the formation of protein carbonyl in HSA by tea catechins is the pyrogallol structural motif in the B-ring, followed by the galloyl group. By both mass spectrometry and electrophoresis/blotting with redox-cycling staining, we revealed that pyrogallol-type catechins had higher reactivity with protein thiols than catechol-type catechins.
3. We synthesized [^{13}C]-ECg, in which the carbonyl carbon of the galloyl moiety was labeled by ^{13}C isotope, and analyzed it by solid-state NMR spectroscopy. Solid-state ^{31}P NMR analysis indicated that ECg changes the gel-to-liquid-crystalline phase transition temperature of DMPC bilayers as well as the dynamics and mobility of the phospholipids. The accurate intermolecular-interatomic distance between the labeled carbonyl carbon of [^{13}C]-ECg and the phosphorus of the phospholipid was determined to be $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ by ^{13}C - ^{31}P rotational echo double resonance (REDOR) measurements.
4. The DEAD-box RNA helicase p68, which is overexpressed in a variety of tumor cells and plays an important role in cancer development and progression, was identified as a novel EGCg-binding target.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：食品化学

1. 研究開始当初の背景

茶には数種類のカテキン類が含まれており、様々な生理機能が調べられた結果、個々のカテキン類の生理活性強度に大きな差があることが明らかになっている。多くの場合、その理由は詳しく調べられていないが、特殊な場合として細胞膜に存在するある種のタンパク質がカテキンの受容体になっていることが報告されている。我々はカテキン類が有する様々な生理作用に共通するメカニズムを分子レベルで明らかにするためには、リン脂質およびタンパク質との相互作用を化学生物学的な立場から解明することが、必要であると考え、「ポリフェノール類が細胞に作用するとき最初に接触するのは細胞膜の脂質二重層である」との仮定に基づき、カテキン類をはじめとした植物ポリフェノールの脂質二重層への作用を10年以上にわたって調べてきた。その過程でリポソームを用いた取り込み量や存在位置の測定、HPLCやQCMを用いた親和性や結合定数の測定、溶液NMRや固体NMRの様々な手法を用いた、リン脂質膜中でのカテキン類の存在位置・配向性・動的挙動の解析等で成果をあげ

てきた。また、結合に関与する様々な因子を明らかにしてきた。

一方、カテキン類は酵素や受容体を含む多くのタンパク質と相互作用することが報告されてきた。最近、我々は、カテキン類と反応するタンパク質の検出法、精製法、結合位置の解析法を開発し、EGCgが血中で安定であること、さらにその安定性に寄与している成分がアルブミンであることを見出した。また、カテキン類が選択的に結合した細胞タンパク質を明らかにすることに成功した。

2. 研究の目的

茶に含まれるカテキン類がその機能発現の過程で、リン脂質膜やタンパク質などの生体成分と、どのような相互作用をするかを、NMR、MS、quartz crystal microbalance (QCM)、電気泳動等の、物理化学的、分析化学的、有機化学的、生物化学的手法を駆使して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) カテキン類 (Fig. 1) の脂質二重層内における分子配向や位置を溶液NMRと固体NMRの様々な手法を用いて、正確に数値化し、図示する。

(2) カテキン類のモデル脂質膜に対する、結合定数、解離定数、結合速度定数、解離速度定数をquartz crystal microbalance (QCM)を用いて明らかにする。

(3) ポリフェノールとタンパク質との相互作用に関して、QCM、MSなどの手段を用いて、共有結合の場合はその化学構造と結合位置、物理的結合の場合は、タンパク質中での位置と配向、さらには疎水結合・水素結合・静電的相互作用等の結合に関与する力の性質を明らかにする。

4. 研究成果

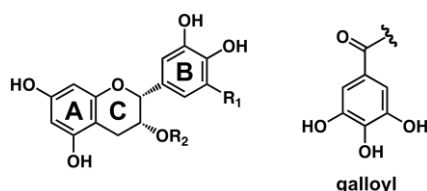
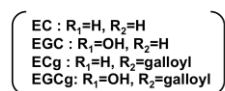


Fig. 1. Structures of tea catechins.



(1) 水晶発振子マイクロバランス

(QCM)を用いて、ECg、EGCgなどのガレート型カテキン類はEGCやECなどの非ガレート型カテキン類に比べてヒト血清アルブミン (HSA) に対する親和性が100倍以上強いことを見出した。(発表論文1)

Table 1. Association constants (K_a) of catechins toward HSA immobilized on QCM

Catechins	K _a [M ⁻¹]
EC	2.1 × 10 ³
EGC	2.8 × 10 ³
ECg	1.4 × 10 ⁵
EGCg	2.5 × 10 ⁵

(2) 酸化EGCgによる結合

酸化したカテキン類が HSAと反応した結果、HSAにカルボニルが生成する。その生成量を検討した結果、カテキン類の構造のうち、B環がピロガロール基であること、ガレート型カテキン類であることの両者が重要であることを明らかにした(発表論文2)。また、質量分析法とレドックスサイクリング染色を伴った電気泳動法により、ピロガロール型のカテキン類がカテコール型よりもタンパク質のチオール基と反応しやすいことを見出した(発表論文3)。EGCgは中性からアルカリ性のpHにおいて不安定であるが、HSAの存在下で安定性が高まる。EGCgのガロイル基がHSAとの相互作用に関わることがHSAによるEGCgの酸化抑制に関係していることを明らかにした。(発表論文4)。

(3) 固体NMR測定

MLV試料の固体³¹P NMR 測定において、異方性を示す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ECgによって破壊されないことを確認した。DMPCで構成されるMLVの相転移温度は23°Cであるが、今回の測定では相転移温度以下である20°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。一方、水和試料の固体¹³C NMR (DD-static) 測定では、 $\delta_{||}$ と δ_{\perp} 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。また、

固体 ^{13}C NMR (DD-MAS, 2000 Hz) 測定において δ_{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。

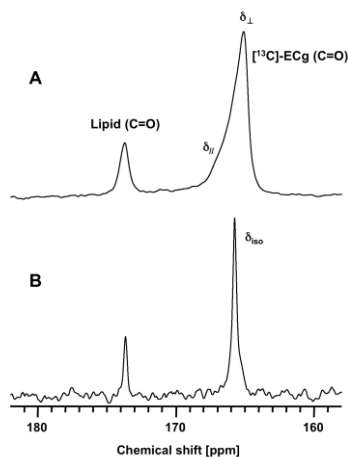


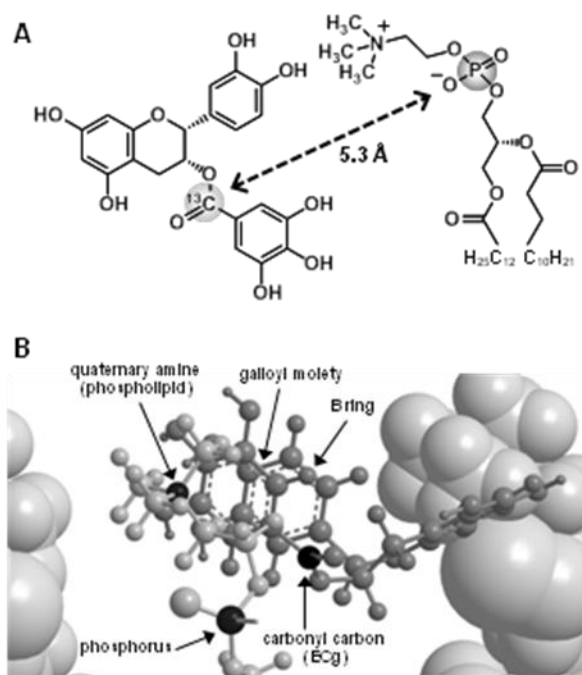
Fig. 3. Solid-state ^{13}C NMR spectra of ^{13}C -ECg (C=O) in DMPC liposomes under the DD-static (A) and DD-MAS (B).

また ^{13}C - ^{31}P rotational echo double resonance (REDOR) 測定法により、ECgのカルボニル炭素とDMPCのリン原子との距離が $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であることを明らかにした (Fig. 4)。(発表論文 5)

Fig. 4 Distance between the ^{13}C -carbonyl carbon and the phosphorus atom (above). Schematic representation of the correlation between ^{13}C -ECg and phospholipid in the ^{13}C - ^{31}P REDOR experiment.

さらに、いままで、本研究室で行った茶カテキン類とリン脂質との分子間相互作用に関する、研究結果を整理し、日本語の総説として公表した。(総説 1)

(4) がん細胞増殖因子との結合



EGCgが、がん細胞の増殖に関与しているDEAD-box RNA helicase p68と結合することを明らかにした。(発表論文 6)

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 7 件)

[原著論文]

1. Kanako Minoda, Tatsuya Ichikawa, Tomoharu Katsumata, Ken-ichi Onobori, Taiki Mori, Yukiko Suzuki, Takeshi Ishii, and Tsutomu Nakayama: Influence of the galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56, 331-334, 2010. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/56/5/56_5_331/_article
2. Takeshi Ishii, Taiki Mori, Tatsuya Ichikawa, Maiko Kaku, Koji Kusaka, Yoshinori Uekusa, Mitsugu Akagawa, Yoshiyuki Aihara, Takumi Furuta, Toshiyuki Wakimoto, Toshiyuki Kan, and Tsutomu Nakayama: Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human

serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 4892-4896, 2010. DOI:

10.1016/j.bmc.2010.06.021

3. Taiki Mori, Takeshi Ishii, Mitsugu Akagawa, Yoshimasa Nakamura, and Tsutomu Nakayama: Covalent binding of tea catechins to protein thiols: Relationship between stability and electrophilic reactivity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2451-2456, 2010. DOI: org/10.1271/bbb.100509

4. Takeshi Ishii, Tatsuya Ichikawa, Kanako Minoda, Koji Kusaka, Sohei Ito, Yukiko Suzuki, Mitsugu Akagawa, Kazuki Mochizuki, Toshinao Goda, and Tsutomu Nakayama: Human serum albumin as an antioxidant in the oxidation of (-)-epigallocatechin gallate: Participation of reversible covalent binding for interaction and stabilization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 100-106, 2011. DOI: 10.1271/bbb.100600

5. Yoshinori Uekusa, Miya Kamihira-Ishijima, Osamu Sugimoto, Takeshi Ishii, Shigenori Kumazawa, Kozo Nakamura, Ken-ichi Tanji, Akira Naito, and Tsutomu Nakayama: Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 1654-1660, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.02.014

6. Tomoko Tanaka, Takeshi Ishii, Daisuke Mizuno, Taiki Mori, Ryoichi Yamaji, Yoshimasa Nakamura, Shigenori Kumazawa, Tsutomu Nakayama, and Mitsugu Akagawa: (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition of human gastric cancer cell line AZ521 cells by targeting the DEAD box RNA helicase p68. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1324-1335, 2011. DOI:

10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024

[総説]

1. 熊澤茂則、中山 勉: 茶カテキン類と脂質膜との相互作用, 化学と生物, 49, 243-249, 2011.

[学会発表] (計 56 件) 2010 年 8 月~2011 年 12 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 特許
発明者: 中山勉、石井剛志、山田智
権利者: 静岡県公立大学法人、日油株式会社
種類: 特願
番号: 2011-253607
出願年月日: 平成 23 年 11 月 21 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodbioc/index.html>

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

熊澤 茂則 (KUMAZAWA SHIGENORI)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号: 10295561

(3) 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

(4) 研究分担者

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