

## 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 16日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780122

研究課題名（和文）フラボノイド類と蛋白質との相互作用解析による生理作用発現機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of interaction between flavonoids and proteins for elucidating their physiological expression mechanisms.

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（和文）：フラボノイド類は、血液や臓器に含まれる蛋白質（標的分子）と複合体を形成することが報告されている。フラボノイド類の標的分子に対する結合親和性の違いは、化学構造に起因しており、その違いが生理活性の発現や強度に重要であると考えられている。本研究では、フラボノイド類のなかでも主に茶に含まれるカテキン類とその類縁体を用いて蛋白質との相互作用を評価し、化学構造と結合親和性の関係を調査した。研究の結果、ガロイル基の有無、B環水酸基の数、およびC環2,3位の立体配置の違いが、血清蛋白質や細胞内の標的蛋白質との結合親和性の強弱に関与することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Previous research has indicated that several flavonoids form complexes with target molecule such as protein in blood and organs, and differences in binding affinity toward the target molecule are believed to determine their biological activity. In this study, the interaction of catechins and their analogs to proteins were evaluated and the relationship between the chemical structure of each catechin and its binding affinity were investigated. The study indicates the galloyl group, the number of hydroxyl groups on the B-ring, and the configuration at C-2 of each catechin influence binding affinity for the serum proteins and the several cellular proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：フラボノイド類、カテキン類、標的蛋白質、相互作用、結合親和性

## 1. 研究開始当初の背景

フラボノイド類の多くは、分子内に複数のフェノール性水酸基を持つポリフェノールであり、高い抗酸化活性を有している。フラボノイド類の示す健康維持・増進効果の一部は、抗酸化活性により説明することができる

が、それだけでは全ての生理作用を説明することはできない。一般的に、物質の化学構造の違いは、生理作用の種類や強度に影響するが、フラボノイド類の化学構造と生理作用の発現に関する詳細は解明されていない。

近年、プロテオミクス技術の発達やケミカ

ルバイオロジー研究の進展により、食品成分と生体成分、とりわけ蛋白質との相互作用が生理作用の発現に重要であることが明らかになった。近年、ガン細胞の増殖抑制に関与するカテキン結合蛋白質として 67-kDa ラミニン受容体が報告され、カテキン類の生理作用発現機構の一端が明らかになった。また、フラボノイド類の化学構造の違いが、生体内の「蛋白質との相互作用」に多様性を与え、多彩な生理機能を示す可能性が示唆された。67 kDa ラミニン受容体は、フラボノイド類の中でもガロイル基を持つカテキン類の示す抗がん作用や抗アレルギー作用を説明し得る蛋白質であり、生理作用の発現機構を議論するうえで重要な標的分子である。したがって、このような標的分子の探索が進めば、様々なフラボノイド類の生理作用の発現機構が明らかになる可能性がある。しかし、フラボノイド類と蛋白質の相互作用を検出し、結合親和性や結合構造を解析するための有効な方法は少なく、標的蛋白質の探索や標的蛋白質に対する結合親和性の評価・解析はほとんど進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

フラボノイド類と蛋白質との相互作用の解析法、特に結合親和性の評価や結合分子の探索に応用できる方法を構築し、標的分子、標的分子に対する結合構造および標的分子に対する結合親和性の強弱を明らかにすることで、フラボノイド類の示す多彩な生理機能の作用機序に関する新たな知見を得ることを目的とした。

(1) フラボノイド類と血中で結合しその体内動態や生理活性強度に影響を与える標的分子であるヒト血清アルブミン (HSA) に着目し、フラボノイド類 (特にカテキン類) の化学構造が HSA に対する結合構造や結合親和性に及ぼす影響を明らかにする。

(2) フラボノイド類と蛋白質との共有結合反応を解析し、フラボノイド類 (特にカテキン類とテアフラビン類) の化学構造が蛋白質との共有結合反応に及ぼす影響を明らかにする。

(3) カテキン類と相互作用する生体蛋白質を探索し、生理機能発現の作用機序に関する知見を得る。

## 3. 研究の方法

(1) フラボノイド類として、フラバノン類、フラバノール類 (カテキン類)、アントシアニジン類、フラボン類およびフラボノール類

を用いた (図 1)。カテキン類として、シス型カテキン類であるエピカテキン (EC)、エピガロカテキン (EGC)、エピカテキンガレート (ECg) およびエピガロカテキンガレート (EGCg) を用いた (図 2)。また、シス型カテキン類の類縁体として、ピロガロール、没食子酸、トランス型カテキン類、メチル化カテキン類およびテアフラビン類を用いた。

HPLC 法、水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法および電気泳動法により、フラボノイド類 (主にカテキン類) と HSA の相互作用を解析する方法を構築し、それらを利用することでフラボノイド類と蛋白質との相互作用に重要な化学構造を解析した。また、得られた知見を基に、カテキン類と HSA の相互作用の意義を検討した。

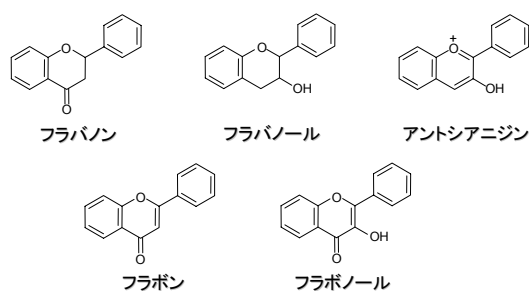


図 1. フラボノイド類の基本骨格

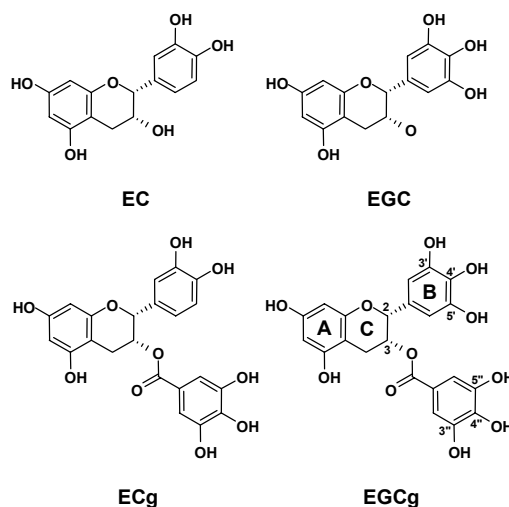


図 2. シス型カテキン類の化学構造

(2) カテキン類として、EC、EGC、ECg および EGCg を用いた。また、カテキン類の類縁体としてメチル化カテキン類およびテアフラビン類を用いた。

カテキン類やその類縁体の安定性を HPLC 法により評価した。また、蛋白質チオール基に対する反応性を質量分析法とレッドクスサイクリング染色を利用した電気泳動法により評価した。得られた知見を基に、カテキ

ン類やその類縁体の溶液中での安定性と蛋白質に対する反応性との関係を調査した。

(3) EGCg が結合した担体 (カテキン結合セファロース) を作製し、血清中および細胞ライゼート中で EGCg と相互作用する蛋白質を探索した。リン脂質膜結合プレートを利用した渋味の評価法を構築・応用して、カテキン類の蛋白質に対する相互作用と体内動態との関係を調査した。

ホウ酸結合ビーズを用いたプロテオミクスにより、EGCg のがん細胞増殖抑制作用に関する標的蛋白質を探索した。

#### 4. 研究成果

(1) はじめに、HSA 結合カラムを備えた HPLC 法により、カラムに対する保持時間を基にフラボノイド類と HSA の結合親和性を評価できる系を構築した (成果・論文⑩)。シス型カテキン類の HSA に対する結合親和性は、EGCg > ECg > EGC > EC の順であった (図 3)。類縁体の結果と比較することにより、ガロイル基の有無、B 環水酸基の数および C 環 2, 3 位の立体配置が HSA との結合に影響することが示唆された。また、得られた結果をメチル化カテキン類などの類縁体の結果と比較することで、血清アルブミンとの相互作用には分子の疎水性だけでなく B 環およびガロイル基の水酸基を介した蛋白質との水素結合も重要であることが示唆された。また、フラバノン類、アントシアニン類、フラボン類およびフラボノール類においても、疎水性相互作用に加えて、B 環の水酸基を介した水素結合が重要であることが示唆された。

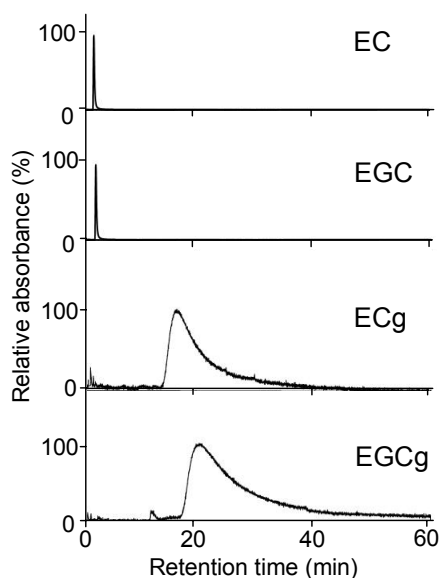


図 3. HPLC 法によるシス型カテキン類と HSA との結合親和性評価

次に、金電極に HSA が結合した QCM 法によりカテキン類と HSA の結合速度定数、解離速度定数および結合定数を決定できる系を構築した (成果・論文⑩)。シス型カテキン類と HSA との結合定数は ECg と EGCg が EC と EGC に比べて大きく (表 1)、HPLC 法により得られた結果を支持するものであった。

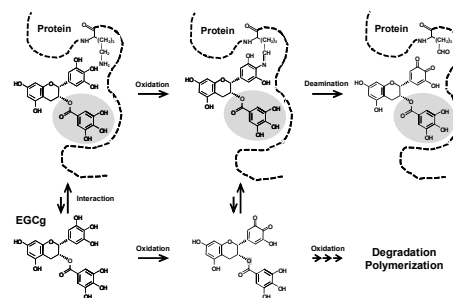
表 1. シス型カテキン類と HSA との結合定数

Catechins	$K_{on} [M^{-1}S^{-1}]$	$K_{off} [S^{-1}]$	$K_a [M^{-1}]$
EC	5.88	$2.75 \times 10^{-3}$	$2.14 \times 10^3$
EGC	8.50	$2.99 \times 10^{-3}$	$2.84 \times 10^3$
ECg	$4.97 \times 10^2$	$3.59 \times 10^{-3}$	$1.38 \times 10^5$
EGCg	$2.24 \times 10^2$	$8.85 \times 10^{-4}$	$2.53 \times 10^5$

さらに、蛋白質カルボニルの検出を指標とした電気泳動法により、カテキン類と HSA との相互作用を解析できる系を構築した (成果・論文⑪)。シス型カテキン類においては、B 環およびガロイル基の水酸基が重要であり、B 環にピロガロール構造を持つカテキン類が B 環にカテコール構造をもつカテキン類よりも高い結合親和性を示すことが確認された。

そして、HSA と結合することによりカテキン類の酸化安定性が高まることを確認し、HSA が EGCg の抗酸化剤となり得ることを見出した (成果・論文②)。また、カテキン類の結合様式や安定化機構を推定した (図 4)。

Stable complex of EGCg with HSA



Unstable complex of EGC with HSA

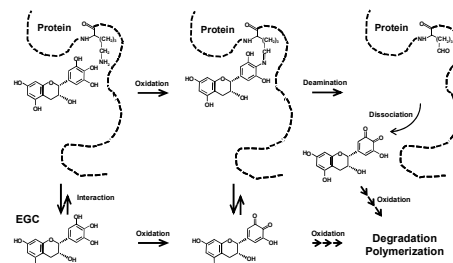


図 4. HSA によるカテキン類の安定化機構

(2) まず、カテキン類が中性から塩基性のpHを示す水溶液中で酸化され易く不安定であるが、一定量以上のアスコルビン酸(AA)、チオール化合物およびシクロデキストリンの共存下で安定化することを確認した(成果・論文④および⑤)。また、安定性は、EGCとEGCgがECとECgに比べて低く、酸化されやすいことが明らかになった。

次に、ペプチドや蛋白質に対する反応性はEGCとEGCgがECとECgに比べて高く、システイン残基のチオール基と共有結合することを確認した(成果・論文⑥および⑨)。また、AAやチオール化合物によりEGCgの酸化を抑制すると蛋白質に対する反応性が低下することが明らかになった(図5)。一方で、テアフラビン類は酸化の有無に関わらず蛋白質中のチオール基と共有結合することが示唆された。

以上の研究成果より、カテキン類と蛋白質中のチオール基との反応性および反応が関与する生理作用の発現には、カテキン類の溶液中における安定性が大きく影響することが示唆された。

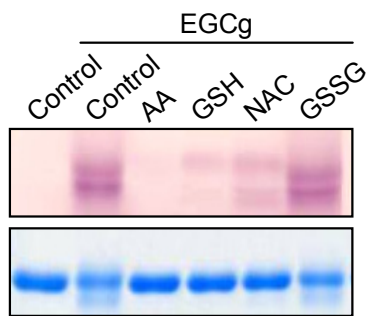


図5. 抗酸化物質の存在下におけるEGCgの蛋白質に対する反応性

(3) まず、作製したカテキン結合セファロース(図6)を用いたプルダウン法によりEGCgが血清中で相互作用する蛋白質を探索し(成果・論文③)、HSA、補体成分およびトランスサイレチンが主要な標的分子であることが示唆された。

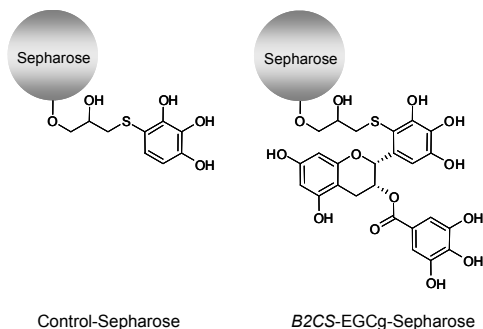


図6. 作製したカテキン結合セファロース

次に、細胞ライゼートを用いて同様の検討を行い、熱ショック蛋白質や細胞骨格系の蛋白質を中心に複数の標的分子候補を見出した(成果・論文⑦)。

さらに、ホウ酸結合ビーズを用いたプロテオミクスにより、EGCgのがん細胞増殖抑制作用に関与する標的蛋白質を探索し(成果・論文①および⑧)、EGF受容体およびDEAD box RNA helicase p68を見出した。

## 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13件)

- ① Tanaka, T., Ishii, T., Mizuno, D., Mori, T., Yamaji, R., Nakamura, Y., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Akagawa, M.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD box RNA helicase p68. *Free Radic. Biol. Med.*, 50, 1324-1335 (2011) 査読有DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.024)
- ② Ishii, T., Ichikawa, T., Minoda, K., Kusaka, K., Ito, S., Suzuki, Y., Akagawa, M., Mochizuki, K., Goda, T., and Nakayama, T.: 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). 査読有DOI: [10.1271/bbb.100600](https://doi.org/10.1271/bbb.100600)
- ③ Katsumata, T., Ishii, T., and Nakayama, T.: Interaction of tea catechins with serum proteins: Development and application of a new probe for understanding the action of catechins. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ④ Kusaka, K., Ishii, T., and Nakayama, T.: Structural characteristics of tea catechins that affect their binding affinity with cyclodextrins. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ⑤ Kusaka, K., Ishii, T., Hiramatsu, M., and Nakayama, T.: Stability of (-)-epigallocatechin gallate in aqueous solutions containing food constituents: Effect of synergy

- between antioxidant property and binding capacity. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ⑥ Mori, T., Ishii, T., Katsumata, T., Akagawa, M., Nakamura, Y., and Nakayama, T.: Electrophilic reactivity of tea catechins toward protein sulfhydryls. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ⑦ Katsumata, T., Ishii, T., and Nakayama, T.: A search for the high-affinity proteins of tea catechins in human cell lysates. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ⑧ Maeda, T., Kubo, Y., Kimura, K., Tanaka, T., Ishii, T., and Akagawa, M.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits EGF signaling via covalent binding to EGF receptor. *Proceedings of the 4th International Conference on O-CHA (Tea) Culture and Science* (2011). 査読無
- ⑨ Mori, T., Ishii, T., Akagawa, M., Nakamura, Y., and Nakayama, T.: Covalent binding of tea catechins to protein thiols: relationship between stability and electrophilic reactivity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 2451-2456 (2010). 査読有 DOI: [org/10.1271/bbb.100509](https://doi.org/10.1271/bbb.100509)
- ⑩ Minoda, K., Ichikawa, T., Katsumata, T., Onobori, K., Mori, T., Suzuki, Y., Ishii, T., and Nakayama, T.: Influence of the galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 56, 331-334 (2010). 査読有 [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/56/5/56\\_5\\_331/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jnsv/56/5/56_5_331/_article)
- ⑪ Ishii, T., Mori, T., Ichikawa, T., Kaku, M., Kusaka, K., Uekusa, Y., Akagawa, M., Aihara, Y., Furuta, T., Wakimoto, T., Kan, T., and Nakayama, T.: Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 4892-4896 (2010). 査読有 DOI: [10.1016/j.bmc.2010.06.021](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.06.021)
- ⑫ Ishii, T., Minoda, K., Bae, M.-J., Mori, T., Uekusa, Y., Ichikawa, T., Aihara, Y., Furuta, T., Wakimoto, T., Kan, T., and Nakayama, T.: Binding affinity of tea catechins for HSA: characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54, 816-822 (2010). 査読有 DOI: [10.1002/mnfr.200900071](https://doi.org/10.1002/mnfr.200900071)
- ⑬ 石井剛志、菅 敏幸: お茶の効能を分子レベルで解明する、*ファルマシア*、46, 1143-1148 (2010). 総説、査読無
- [学会発表] (計12件)
- ① 林 美香、石井剛志、平松未宇、中山 勉: 紅茶テアフラビン類の蛋白質に対する反応性、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 23 日 (京都)
- ② Akagawa, M., Tanaka, T., Mizuno, D., Mori, T., Yamaji, R., Nakamura, Y., Kumazawa, S., Nakayama, T., and Ishii, T.: (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD box RNA helicase p68. 2011 International Conference of Food Factors, 2011 年 11 月 21 日 (Taipei, Taiwan)
- ③ 山本祥平、石井剛志、勝間田知治、中山 勉: エピガロカテキンガレートと細胞膜との相互作用に血清蛋白質が及ぼす影響、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日 (京都)
- ④ 山本祥平、勝間田知治、石井剛志、中山 勉: エピガロカテキンガレートと相互作用する血清蛋白質: アルブミンとトランスサイレチンの関係、第 8 回日本カテキン学会総会、2011 年 9 月 22 日 (京都)
- ⑤ 北村実穂、石井剛志、中山 勉: カテキン類とカフェインの生体成分に対する結合親和性評価、第 8 回日本カテキン学会総会、2011 年 9 月 22 日 (京都)
- ⑥ 上園博美、石井剛志、中山 勉: テアフラビン類と生体成分との相互作用解析、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日 (東京)
- ⑦ 勝間田知治、石井剛志、中山 勉: カテキン類結合セファロースを用いた標的蛋白質の探索、日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 27 日 (京都)
- ⑧ Katsumata, T., Ishii, T., and Nakayama, T.: Interaction of tea catechins with serum and cell proteins. *Biochemistry and Molecular Biology* 2010, 2010 年 12 月 7 日 (神戸)
- ⑨ Mori, T., Ishii, T., and Nakayama, T.: Structural characteristics of tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin.

Biochemistry and Molecular Biology  
2010, 2010年12月7日(神戸)

- ⑩ 勝間田知治、石井剛志、蓑田香奈子、森 大気、伊藤創平、中山 勉: カテキン類とヒト血清アルブミンとの結合特性、第15回日本フードファクター学会、2010年10月4日(仙台)
- ⑪ 勝間田知治、石井剛志、森 大気、中山 勉: カテキン類と親和性の高い細胞タンパク質の探索、第57回日本食品科学工学会大会、2010年9月3日(東京)
- ⑫ 石井剛志、勝間田知治、日下耕二、市川達也、尾登賢一、蓑田香奈子、加来麻衣子、森 大気、伊藤創平、中山 勉: カテキン類と血清タンパク質との相互作用、第64回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月23日(徳島)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: ポリフェノール類化合物の苦渋味の評価方法

発明者: 中山 勉、石井剛志、山田 智

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2011-253607

[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

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