

19

研究領域3

茶ポリフェノールと生体成分の相互作用の解明


Interaction of tea polyphenols with biological substances

中山 勉

Tsutomu NAKAYAMA

生活健康科学研究科食品栄養科学専攻食品分子工学研究室 教授

Professor, Laboratory of Molecular Food Engineering, Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka



Profile

1999年 静岡県立大学食品栄養科学部教授
1993年 静岡県立大学食品栄養科学部助教授
1988年 名古屋大学農学部助手
1986年 ルイジアナ州立大学客員教授
1985年 農学博士（東京大学）
1981- 国立がんセンター研究所生物物理部研究員
1988年 東京大学大学院農学系研究科修士課程修了
1980年 東京大学農学部卒業
1978年

Contact

TEL 054-264-5522
+81-54-264-5522
e-mail nkymttm@u-shizuoka-ken.ac.jp
U R L http://sfn.u-shizuoka-ken.ac.jp/foodbioc/lab/English/index-2.html

序論

緑茶は様々な生理機能を有することがよく知られている。その主要な成分である茶カテキン類のうちepicatechin gallate (ECg)やepigallocatechin gallate (EGCg)などのガレート型カテキン類は抗菌効果や抗酸化性などの作用を持つことが報告されている。我々は茶カテキン類の多くの生理活性強度はリン脂質やタンパク質などの生体成分に対する親和性を反映しているとの仮説に基づき、様々な化学的研究を行ってきた。例えば、カテキン類のリポソームへの取り込み量に基づき、ガレート型カテキン類が生体膜に対して高い親和性を持つことを明らかにした。本プログラムでは茶カテキン類のリン脂質とタンパク質に対する相互作用を詳細に明らかにすることを目的とした。

成果

水晶共振子マイクロバランス (QCM)を用いた結合定数の測定や、人工リン脂質膜を結合相に固定化したカラムを備えたHPLCによる分配係数の測定により、茶カテキン類のリン脂質に対する親和性が次の順番であることを確認した (ECg>EGCg>epicatechin (EC)> epigallocatechin (EGC)) (図1)。これは茶カテキン類のリン脂質に対する親和性が疎水性と密接な関係があることを示している。

バイセルを用いた溶液NMRにより、カテキン類がリン脂質膜の表面と相互作用することや、ECgとEGCgのB環とガロイル基がホスファチジルコリンのトリメチルアンモニウム基の近傍に存在することを示唆する結果が得られた。さらに固体²H NMRにより、カテキン類とリポソームのリン脂質二重層との分子間相互作用を直接的に観測することができた。また、カルボニル炭素を¹³CでラベルしたECgを合成し、リポソーム存在下、固体¹³C NMRの測定を行った。この実験条件において、¹³C-³¹P rotational echo double resonance (REDOR)の測定が可能であることが判明し、¹³Cでラベルしたカルボニル炭素とホスファチジルコリンのリンの間の原子間距離が5.3 ± 0.1 Åであることを初めて明らかにした (図2)。以上の研究結果に基づき、ECgとEGCgが脂質膜表面、特にホスファチジルコリンのコリン残基と相互作用するモデルを提唱するに至った (図3)。

一方、ヒト血清アルブミン (HSA) を結合相に持つカラムを備えたHPLCを用いて、ガレート型カテキン類がECやEGCなどの非ガレート型カテキン類に比べて、HSAに対する結合親和性が高いことを明らかにした。

展望

ガレート型カテキン類は非ガレート型カテキン類よりも苦く渋いことが明らかになっている。これは味の強度と生理活性強度がカテキン類と生体成分間の相互作用を通じて密接に関連していることを示唆しており、茶の渋味機構の解明、渋味評価法の開発、渋味抑制物質の探索等につなげる予定である。

Introduction

Green tea is well known for its various physiological effects. Among tea catechins, the galloylated catechins, epicatechin gallate (ECg) and (–)-epigallocatechin gallate (EGCg), reportedly have beneficial properties including chemopreventive, anticarcinogenic and antioxidant actions. We have focused on chemical studies relating the affinities of tea catechins for biological substances to the mechanisms of their biological activities. Based on the amounts of catechins incorporated into liposomes, we have reported that galloylated catechins have high affinity for model biological membranes. In this program, we tried to clarify in detail the interactions of tea catechins with phospholipids and proteins.

Results

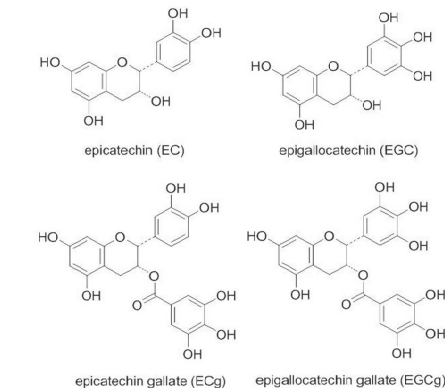
The association constants obtained by quartz-crystal microbalance, and partition coefficients for phospholipids using high-performance liquid chromatography (HPLC) with an immobilized artificial membrane column show the following order of affinity: ECg > EGCg > epicatechin (EC) > epigallocatechin (EGC) (Fig. 1). Thus, their affinity for phospholipids is linked to their hydrophobicity.

In our solution nuclear magnetic resonance study using bicelles, we found that catechins interact with the surface of phospholipid membranes, and the B ring and galloyl moiety of ECg and EGCg are closely located near the trimethylammonium group of phosphatidylcholine. Furthermore, we used liposomes and solid-state ²H NMR analysis to obtain direct evidence of the molecular interaction between catechins and phospholipid bilayers. By solid-state ¹³C NMR analysis and ¹³C–³¹P rotational echo double resonance (REDOR) measurements, we accurately determined the intermolecular-interatomic distance between the labeled carbonyl carbon of [¹³C]-ECg and the phosphorus of the phospholipid to be 5.3 ± 0.1 Å (Fig.2). Based on these studies, we propose that ECg and EGCg interact with the surface of lipid membranes via the choline moiety of phosphatidylcholine (Fig. 3).

By HPLC analysis with a human serum albumin (HSA) column, we showed that galloylated catechins have higher binding affinities for HSA than do non-galloylated catechins such as EC and EGC.

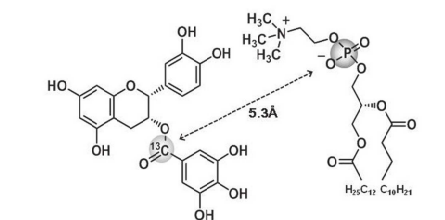
Perspectives

Because galloylated catechins are reportedly more bitter and astringent than non-galloylated catechins, it is possible that tastes and biological activities of tea catechins are closely linked. We are investigating the mechanisms of astringency of tea catechins by the new methods that we have developed and are searching for food substances that inhibit astringency.



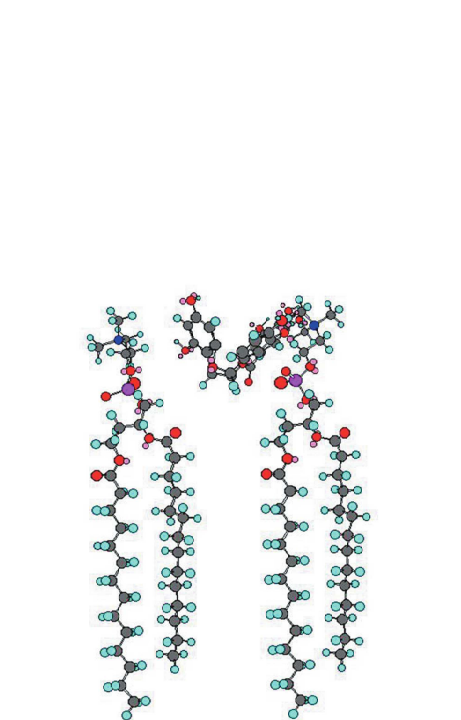
【図1】
茶カテキン類の化学構造式

【Figure 1】
Chemical structures of tea catechins.



【図2】
¹³C-³¹P REDOR測定により明らかになったECgのカルボニル炭素とリン脂質のリン原子間の距離

【Figure 2】
Intermolecular-interatomic distance between the labeled carbonyl carbon of [¹³C]-ECg and the phosphorus of the phospholipid measured by ¹³C–³¹P REDOR.



【図3】
ECgとDMPCから構成されるリン脂質膜との相互作用を反映したball-and-stickモデル

【Figure 3】
Ball-and-stick model of the interaction of ECg with phospholipid-bilayer consisting of dimyristoyl phosphatidylcholine

代表的な発表論文と研究業績 / Major Publications and Achievements

- Y. Uekusa, M. Kamihiro-Ishijima, O. Sugimoto, T. Ishii, S. Kumazawa, K. Nakamura, K. Tanji, A. Naito, and T. Nakayama: Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1808, 1654-1660 (2011)
- T. Ishii, K. Minoda, M.-J. Bae, T. Mori, Y. Uekusa, T. Ichikawa, Y. Aihara, T. Furuta, T. Wakimoto, T. Kan, and T. Nakayama: 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)
- Y. Uekusa, Y. Takeshita, T. Ishii, and T. Nakayama: Partition coefficients of polyphenols for phosphatidylcholine investigated by HPLC with an immobilized artificial membrane column. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 3289-3292 (2008)
- M. Kamihiro, H. Nakazawa, A. Kira, Y. Mizutani, M. Nakamura, and T. Nakayama: Interaction of tea catechins and lipid bilayer models investigated by quartz-crystal microbalance analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 1372-1375 (2008)
- Y. Uekusa, M. Kamihiro, and T. Nakayama: Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9986-9992 (2007)