

博士論文

熱力学的解析を基盤とした
茶カテキン-蛋白質間の分子認識機構の解明

高橋 知也

2018 年度

(平成 30 年度)

東京大学大学院

工学系研究科

バイオエンジニアリング専攻

津本研究室

指導教員 津本 浩平 教授

目次

第1章 序論

1.1 食品中の機能性成分	10
1.2 機能性食品と医薬品との違い	10
1.3 分子間相互作用解析の重要性	11
1.3.1 分子間相互作用	11
1.3.2 分子間相互作用の解析	12
1.4 茶カテキンの機能性	13
1.5 本研究の目的	14
1.6 本研究のスキーム	15

第2章 茶カテキン-ヒト血清アルブミン (HSA) 間の分子認識機構の解明

2.1 ヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA)	18
2.1.1 HSA の機能および構造	18
2.1.2 HSA とカテキン類との相互作用 (先行知見) とその意義	19
2.2 本研究の目的と戦略	20
2.3 HSA とカテキン類との相互作用解析手法	21
2.3.1 等温滴定型カロリメトリー測定 (ITC)	21
2.3.1.1 カテキン類と HSA との相互作用解析	22
2.3.1.2 NaCl 存在下でのカテキン類 - HSA 間の相互作用解析	22
2.3.1.3 サイトマーカー存在下での EGC _g または EGC-HSA 間の相互作用解析	23
2.3.2 示差走査型熱量測定 (DSC)	24
2.3.3 NMR 法	24
2.3.3.1 Saturation Transfer Difference (STD) 法	25
2.3.3.2 Interligand NOEs for Pharmacophore Mapping (INPHARMA)	26
2.3.4 計算化学 (ドッキングシミュレーション)	26
2.3.4.1 Interface Score	26
2.3.4.2 埋没表面積 (Buried surface area; BSA)	27
2.3.4.3 形状相補性 (Shape complementarity; Sc)	28
2.4 HSA とカテキン類との相互作用解析結果	28
2.4.1 ITC を用いた結合比、結合親和性、熱力学的パラメーターの取得	28
2.4.2 DSC を用いた HSA-カテキン類の相互作用による HSA の熱安定性評価	23
2.4.3 HSA へのカテキン類の結合部位の検証	35
2.4.3.1 ITC を用いた競合阻害実験	36
2.4.3.2 NMR を用いたカテキン類の HSA 結合部位の同定	37

2.4.3.2.1	STD 法を用いた HSA-EGCg の相互作用解析	37
2.4.3.2.2	INPHARMA 法による EGCg の HSA 結合部位の解析	39
2.4.4	<i>in silico</i> による HSA-カテキン類の相互作用解析	41
2.4.4.1	HSA-Ligand 間の Interface Score	41
2.4.4.2	HSA-Ligand 間の埋没表面積 (BSA)	43
2.4.4.3	HSA-Ligand 間の形状相補性 (S_c)	44
2.4.4.4	HSA-Ligand 間相互作用の熱力学パラメーター (<i>in silico</i>)	44
2.5	本研究のまとめ	47

第 3 章 異なる物性を有した蛋白質の茶カテキン結合に関する分子認識特性

3.1	本研究の目的と戦略	50
3.2	標的蛋白質とカテキンとの相互作用解析	50
3.2.1	標的蛋白質の選択方法	50
3.2.2	標的蛋白質との相互作用解析	53
3.2.2.1	分子量、等電点が異なる蛋白質を標的とした相互作用解析	53
3.2.2.2	局所構造の異なる蛋白質による EGCg への分子認識の相違	54
3.3	データベースを用いた標的蛋白質とカテキンとの相互作用解析	57
3.3.1	標的蛋白質の検索方法	57
3.3.2	標的蛋白質の取得	57
3.3.3	ERK2 と EGCg の相互作用解析	61
3.3.3.1	発現・精製	63
3.3.3.2	ERK2 との相互作用解析	66
3.3.3.2.1	ITC 測定	66
3.3.3.2.2	DSF 測定	66
3.3.3.2.3	ERK2 の阻害剤 FR180204 を用いた Competitive assay	67
3.4	本研究のまとめ	69

第 4 章 蛋白質に対する茶カテキンの官能基レベルにおける分子認識特性

4.1	本研究の目的と戦略	72
4.2	Ovalbumin とカテキン類との相互作用解析	72
4.2.1	親和性および熱力学パラメーターの取得	72
4.2.2	結合部位の相同性の検証	75
4.2.2.1	EGCg と Caffeine との Competitive assay	76
4.2.2.2	EGCg と EGC との Competitive assay	77
4.2.2.3	EGCg と EGC の Ovalbumin への相互作用による熱安定性への影響	77
4.2.3	結合におけるガロイル基が担う役割	78

4.2.3.1	Ovalbumin と Ethyl gallate との相互作用解析	78
4.2.3.2	Ovalbumin と EGCg メチル化誘導体との相互作用解析	79
4.3	様々な蛋白質とガロイル基を有さないカテキン類との相互作用解析	80
4.3.1	EGCg 結合蛋白質と EGC との相互作用解析	80
4.3.2	ERK2 と EGC との相互作用解析	81
4.3.2.1	ITC 測定	81
4.3.2.2	DSF 測定	82
4.3.3	データベースを用いた標的蛋白質とカテキン類との相互作用	83
4.4	本研究のまとめ	84
第5章 総括および今後の展望		
5.1	本研究のまとめ	86
5.2	今後の展望	87
5.2.1	カテキンの化学構造と標的蛋白質が示す機能への影響との関係性	87
5.2.2	カテキンと標的分子の速度論解析、ダイナミクス解析	88
参考文献		89
謝辞		101

第 1 章

序論

第1章 序論

1.1 食品中の機能性成分

「医食同源」という文言があるように、医薬品同様に食事をすることも生命を養い健康を保つための手段であり、健康を維持するための重要な因子であることは言うまでもない。また、1984年から1986年にかけて実施された特定研究「食品機能の系統的解析と展開」の中で、栄養機能（栄養素やカロリーの供給）を一次機能、感覚機能（味・香り・美味しさ）を二次機能と定義、さらに、食品には生体調節機能（生体制御、疾病の防止、疾病の回復、老化抑制など）があることを明確にし、三次機能を有する食品を「機能性食品」とした。その後、1991年に栄養改善法の一部改正によって、厚生省（現厚生労働省）は、国の審査を合格した機能性食品を「特定保健用食品」の名称で登録する認可制度を発足させた。従来このような健康強調表示（ヘルスクレーム）は医薬品にのみ許可されており、それが食品で許可されたことは、世界初であることから、国際的に大きな話題となった。「Japan explores the boundary between food and medicine：日本は食品と医薬品の境界に踏み込む」というタイトルで、英国の著名な自然科学誌『ネイチャー』がニュース記事を掲載したほどである¹。2017年10月現在、1000件を超える「特定保健用食品」の許可商品があることからわかるように、食品に対しても医薬品同様に、機能を求める声が高まっている。さらに特定保健用食品制度が始まって14年、2015年4月からは、機能性表示食品制度が始まった。この制度は、安全性の確保を前提とし、科学的根拠に基づいた機能性が、事業者の責任において表示される制度であり、消費者の方が機能性を持った商品をわかりやすくかつ手取りやすくする国の制度である。このことから国を挙げて食品の機能性を生かす取り組みが行われていることがうかがえる。

1.2 機能性食品と医薬品との違い

先に述べた機能性食品と医薬品の違いはなんなのであろうか。からだの生理学的機能などに影響を与える保健機能成分を含む食品である機能性食品は、あくまで食品であり健康意識向上、改善へとつながる緩やかな効果、食経験と安全性を兼ね備えた予防医学であるQOL (Quality of life) の向上を目的としている。それ故に、医薬品が担う治療医学と異なり、即効性が乏しいという欠点もある。一般的に食経験の有無を問わず化学物質である有効成分を高濃度に配合した医薬品とは異なり、前述のとおり食品は食経験の範疇で安全性を担保している分、有効成分の含有量は多くない。また、医薬品のように標的分子をもとに設計されておらず、それ故に低い標的分子への特異性を示す。さらに、生体利用率を向上させるために、化合物の物性の一つである親疎水性制御を目的とした分子構造修飾などの手法がとれる医薬品と比べ、食品は食経験を重視する故、そのような手法が取れず、低い生体利用率を示す²。その一方、前述のように、健康への有効性を有した食品において多くの活性成分も見つかっている³。しかし、作用機序が明確な医薬品と比べ、標的分子などの作

用機序情報が乏しい食品成分においては活性成分をリード化合物とした高活性化戦略が取れないのが現状である。つまり、機能性食品成分の化学構造に基づく物性を理解すること、さらには、標的分子を探索、理解することが重要であり、両者の情報を得ることで、標的分子への機能性食品成分の相互作用つまりは結合性を高め、特異性を持たせることができ、現状の課題を打破できると考える (Figure 1)。

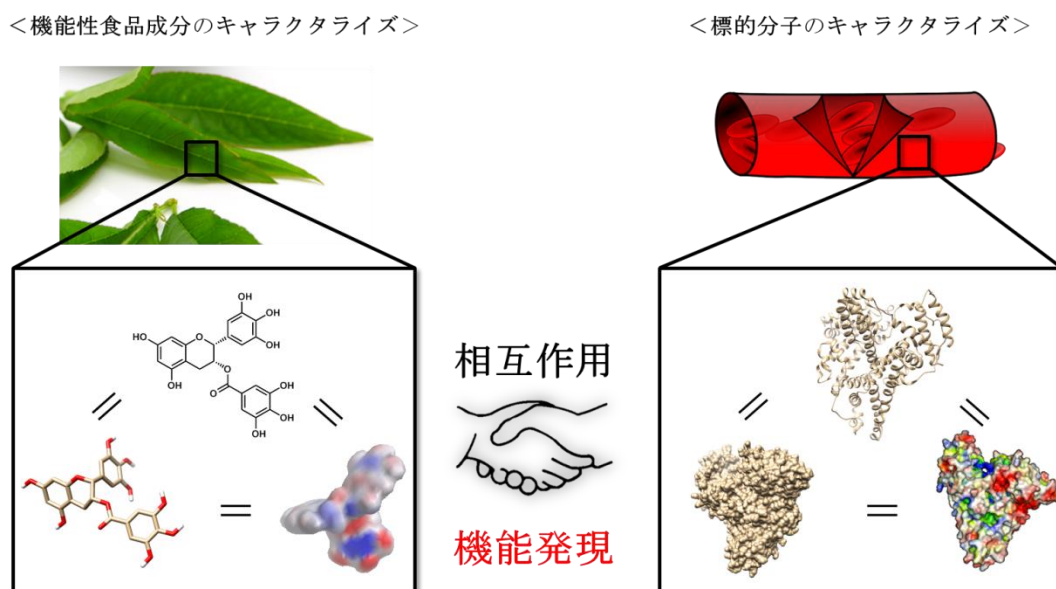


Figure 1. 機能性食品成分、標的蛋白質の理解による機能発現制御の概念図

1.3 分子間相互作用解析の重要性

1.3.1 分子間相互作用

分子間力は、分子と分子の間に働く力のことをいい、分子間相互作用つまりは分子間の関係性を表す重要な因子である。特に生体内においては、この分子間力が働くことで、生体の構造や機能が生まれている。分子間には引力や反発力といった分子間力が働く。具体的には、静電相互作用、van der Waals 力、水素結合、疎水性相互作用などである。これらが、複雑に作用しあうことで生命活動が行われることは言うまでもない。とりわけ、分子間相互作用の理解が重要とされるのが、医療分野においてである。医薬品、特に近年開発が進んでいる抗悪性腫瘍薬は標的蛋白質に結合することで、がん細胞を死滅させることができる分子標的治療の 1 つの手法である。分子標的薬は明確な標的分子が決まっているため、高い薬効が期待できる、副作用が少ないなど利点が多く、広く医療現場で用いられている⁴。その代表的な分子が抗体医薬品であり、抗原（標的分子）への認識特異性をもち、臨床応用を実現するため、研究開発が行われている^{5,6}。つまり、分子標的薬の活性を左右する要因は主に標的分子との相互作用特性（特異性および親和性）であるといえる。

1.3.2 分子間相互作用の解析

分子間相互作用を理解するにはどのような手法があるのだろうか。その 1 つに、免疫沈降法がある⁷。この手法は、ある蛋白質と蛋白質が結合することで大きな構造体となり、重さが重くなることで、ある蛋白質に結合する標的蛋白質を検出する手法である。この手法は、相互作用の有無はわかるものの、前述したような分子間の特異性などの特性を検証する手法としては適していない。例えば、花粉症に高い薬効を示す医薬品の開発を例とする。花粉症はアレルゲンとなる蛋白質が体内に侵入した際、IgE などの抗体と結合することで、ヒスタミンなどの様々な神経伝達物質が細胞外へと放出され、体内の標的蛋白質に結合することで、くしゃみや鼻水といった症状となることが知られている⁸。花粉症薬はヒスタミンが標的蛋白質に結合する目に結合することで、ヒスタミンとの結合を阻害し、症状を緩和させることが可能となる。その一方で、花粉症薬が標的蛋白質にヒスタミンよりも前に結合しても、親和性が弱いまたは、解離が早いと十分な薬効を発現しないことが考えられる。つまり、結合するか否かだけでなく、相互作用の強さや結合速度を知ることは重要である。さらに、創薬研究者を驚かせた事例がある。Freire らは、今日までに上市された HIV プロテアーゼ阻害薬に対する標的蛋白質である HIV プロテアーゼおよびとの相互作用を等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて測定し、熱力学的パラメーター (ΔG , ΔH , ΔS) を決定した (Figure 2A)⁹⁻¹¹。そして得られたパラメーターと阻害薬の発売順を比較した結果、親和性を表す ΔG は新薬となるほど負に大きい、つまり親和性が大きくなることを明らかとした。さらに、 ΔH は新薬ほど、負に大きな値を示した。 ΔH は一般的に化合物と蛋白質の直接的な相互作用が生じる際に得られると考えてよい。Freire らの研究は、ファーストインクラスと称される最初に承認された薬に対して、後発品は活性面、副作用、薬物動態や安全性などが改良されていると考ええると、 ΔG に対する ΔH の寄与を高めることが良い医薬品を開発するうえでの重要な戦略となることを示した事例である。Kawasaki らは Farnesyl Pyrophosphate Synthase に対する上市阻害薬である Bisphosphonate 類との ITC による熱力学解析において同様の結果を得ている^{10,12}。このように、親和性の有無、強さだけでなく、詳細な相互作用特性を知ることが重要であると考えられる。そこで、本研究では、熱力学解析を基盤としてより詳細な相互作用特性を記述することを念頭と置いた。

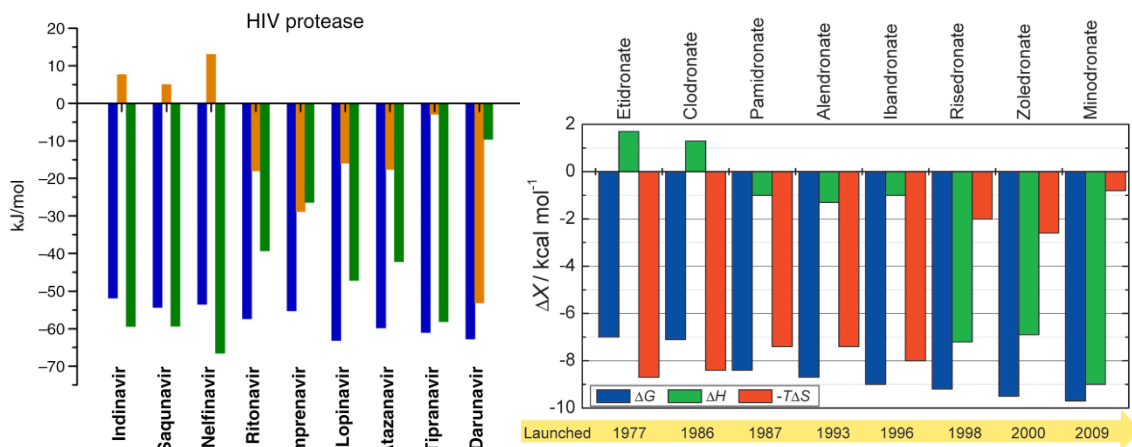


Figure 2. 標的蛋白質に対する上市された阻害剤の熱力学的プロファイルの変遷
 (A) HIV protease—Drug、(B) Farnesyl Pyrophosphate Synthase—Drug^{10, 12}

1.4 茶カテキンの機能性

近年、機能性食品として注目が集まっている素材に、ポリフェノールがある。ポリフェノールは、同一分子内に2個以上のフェノール性水酸基（ベンゼン環、ナフタレン環などの芳香族環に結合した水酸基）をもつ化合物の総称で、様々な種類があり¹³、様々な食品に含まれていることが知られている^{14, 15}。Kanazawaらは、食品中に含まれるポリフェノールの含量を分析した結果、Green tea（緑茶）が最もポリフェノール含量が多いことを明らかにした（Figure 3）¹⁶。

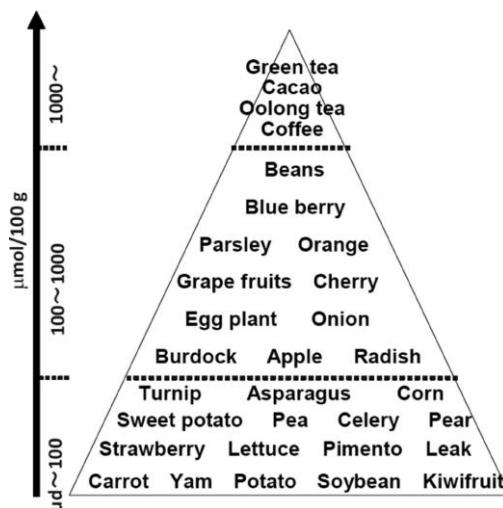


Figure 3. ポリフェノールピラミッド

緑茶は、ツバキ科カメリア属のチャノキの葉から作られる飲料であり、様々な効能が既に知られている。緑茶葉中に約10~20%含まれる茶カテキンが機能性成分とされている。Epigallocatechin gallate (EGCg)、Epicatechin gallate (ECg)、Epigallocatechin (EGC)、Epigallocatechin

(EC) の計 4 種類の茶カテキンが緑茶葉中には主に含まれている (Figure 4)。

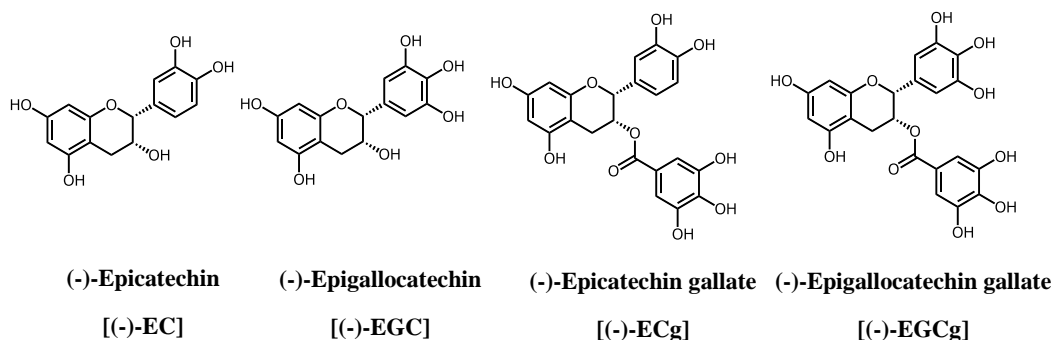


Figure 4. カテキン類の化学構造

これらの茶カテキンは、抗がん性、抗ウイルス活性などの様々な生理効果を示すことが知られている¹⁷⁻²⁵。また、生理効果に限らず、カテキン類の化学構造内の官能基ごとの物性の違いについても報告がある。Figure 5 に示す A, C 環はアルデヒドと反応し、ポリマー化することが知られている²⁶。B 環はラジカル種を発生させることが知られている²⁷。ガロイル基は、生理活性^{28,29}、苦渋味³⁰、凝集性³¹などに関与することが知られている。

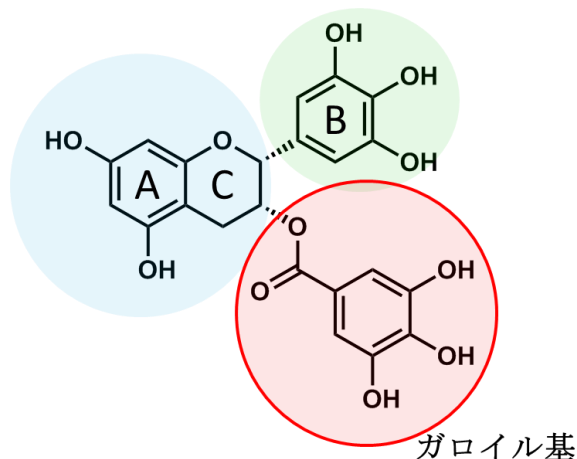


Figure 5. カテキン類の官能基ごとの化学構造

1.5 本研究の目的

前述のようにカテキン類には様々な機能を示すことが知られている一方で、カテキンの構造に焦点を当てると、原子レベルでの相互作用する相手 (標的分子) への役割に着目した研究例はほとんどない。つまり、茶カテキンが標的分子と相互作用することによって、機能を示すことは知られている一方で、標的分子をどのように認識しているかは明らかにされていない。そこで、その分子認識機構が明らかにすることができれば、カテキン類の機能をより理解、制御することができると考えた。すなわち本研究の目的はカテキン類の他分子認識機構の解明であり、最終目的としては、理解することで茶カテキンと他分子と

の相互作用制御を通して、生じる現象の制御を行うことである (Figure 6)。

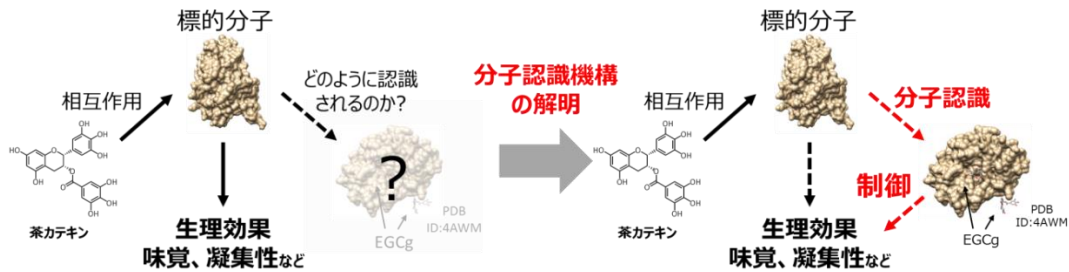


Figure 6. 本研究の目的

1.6 本研究の研究戦略

目的を達成するための研究スキームを Figure 7 に示す。まず、モデル蛋白質である血清アルブミンとカテキン類との相互作用解析を通して、評価系の確立を行う。続いて、その他評価すべき様々な物性を示す蛋白質を選択し、カテキン類との相互作用解析を行い、カテキンが有する他分子認識機構を明らかとする。それと同時に相互作用に伴う現象の評価を行う。そして、得られた現象と相互作用解析から重要な因子を解明し、その現象を制御する添加剤の選択、設計を行う予定である。博士論文の中では、カテキンが有する他分子認識機構の解明を行うことを目的とする。

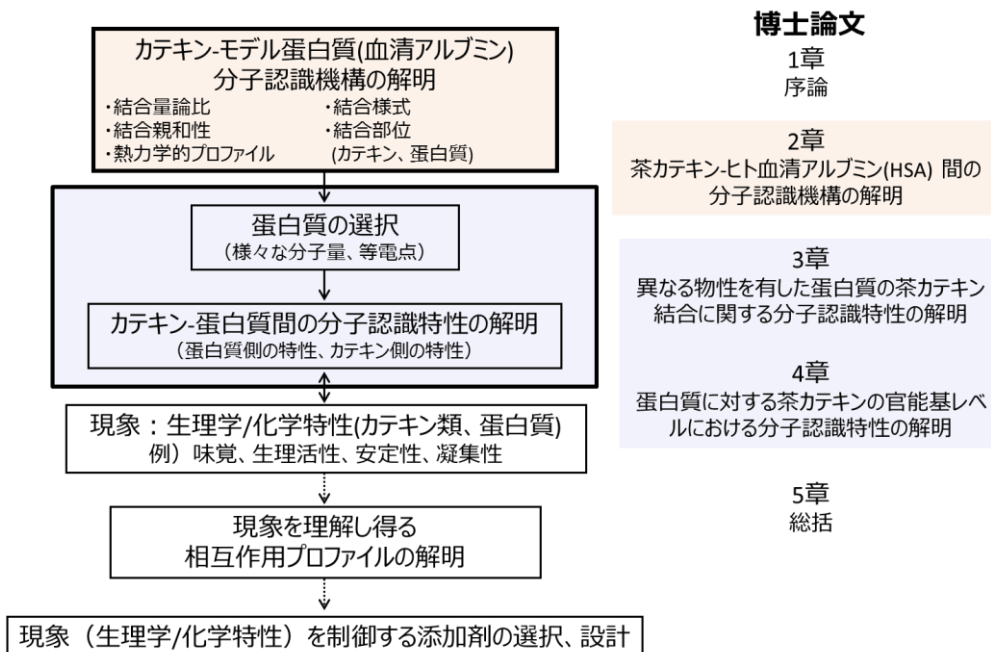


Figure 7. 本研究のスキーム

第 2 章

茶カテキン-ヒト血清アルブミン (HSA) 間の 分子認識機構の解明

第2章 茶カテキン-ヒト血清アルブミン (HSA) 間の分子認識機構の解明

2.1 ヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA)

2.1.1 HSA の機能および構造

HSA は血清中で最も多く存在する蛋白質であり、機能として、遊離脂肪酸やビリルビン、ホルモンやカルシウム、銅、亜鉛といった金属、代謝物、更には医薬品などと結合し、目的の臓器に運ぶ輸送蛋白質としての働きの他、貯蔵蛋白質としての働き、浸透圧の維持、酸化還元作用などを有する。また、臨床現場においては、肝機能の指標蛋白質であり、アルブミン濃度が低値を示す場合、肝疾患や栄養失調が疑われる。その一方、熱傷やネフローゼ症候群などによるアルブミンの喪失が生じた場合、肝硬変症などによるアルブミンの生体内合成能が低下した場合などにはアルブミン製剤として、注射または点滴によって静脈内に投与される。このように、血清アルブミンは、生体内で重要な働きをする蛋白質である。構造を見ると、585 個のアミノ酸からなり、分子量は約 66.5KDa の 1 本鎖球状蛋白質で、分子内に 3 つのドメインであるドメイン I (1-195 残基)、ドメイン II (196-383 残基)、ドメイン III (384-585 残基) に分かれている。また、9 つのループならびに 17 本のジスルフィド結合を有する。構造内には、サブドメイン II A に位置する site I、サブドメイン III A に位置する site II と呼ばれる薬物結合サイト、そして脂肪酸が結合する site が存在し、それら site で様々なリガンドと相互作用することが知られている (Figure 8) ^{32,33}。

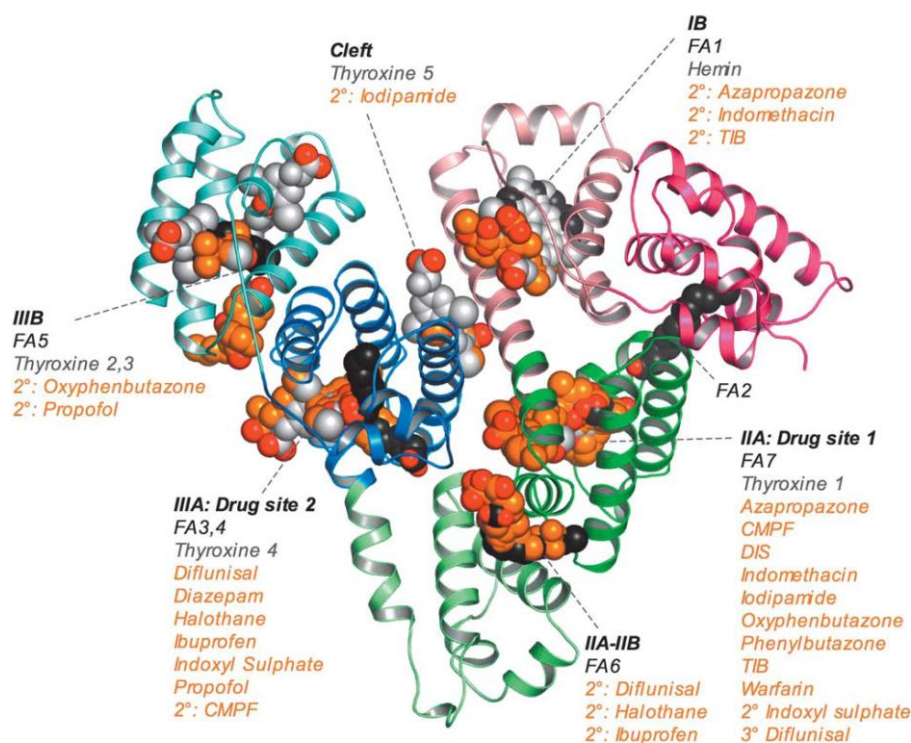


Figure 8. HSA と様々なリガンドとの結晶構造 ³³

2.1.2. HSA とカテキン類との相互作用（先行知見）とその意義

薬物以外にも、カテキン類が HSA と相互作用することは知られている³⁴⁻³⁷。Pal らは、蛍光測定にてカテキン類と HSA が相互作用することを明らかとした³⁴。また、石井らは、水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法 (Figure 9)³⁵、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用い³⁶、Zinellu らはアフィニティーキャピラリー電気泳動を用いて HSA とカテキン類が相互作用することを見出している³⁷。これらの研究から、カテキン類の化学構造の中で、Figure 5 に示されるガロイル基が親和性獲得に重要な官能基であることが示唆されている。つまり、ガロイル基を有する EGCg および ECg の方が、ガロイル基を有さない EGC および EC よりも親和性が高いということである。

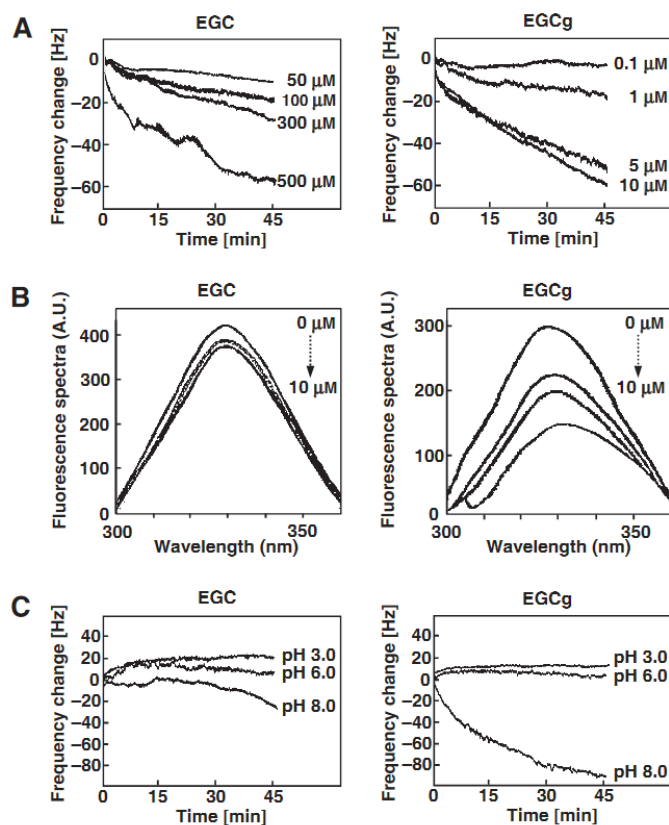
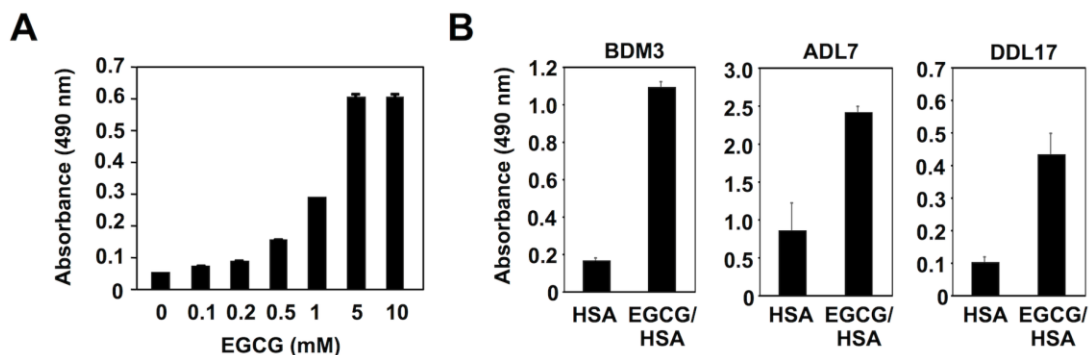


Figure 9. HSA と EGC および EGC との相互作用³⁶

HSA とカテキン類の相互作用に焦点を当てた報告例がある一方で、その機能面に焦点を当てた研究もある。内田らは、EGCg と HSA をインキュベートすることにより、マウス血清中の IgM 自然抗体との交差性が上昇することを明らかとしている (Figure 10)³⁸。つまり、EGCg が HSA と反応することで、内因性抗原と類似する特性を生み出し、自然免疫応答を活性化することを示した初めての研究例である。



(A) Dose-dependent transformation of HSA into innate epitopes by EGCG. HSA (1 mg/ml) was incubated with EGCG (0–10 mM) in 0.1 ml of PBS (pH 7.4) for 24 h at 37°C. Cross-reactivity with the IgM mAb BDM1 was examined by ELISA. (B) HSA (1mg/ml) was incubated with EGCG (1 mM) in 0.1 ml of PBS (pH 7.4) for 24 h at 37°C. Cross-reactivity with the IgM mAbs, BDM3, ADL7, and DDL 17, was examined by ELISA.

Figure 10. EGCg による自然免疫応答性の活性化³⁸

2.2. 本研究の目的と戦略

前述のように、カテキンの構造に由来する相互作用特性の違いが明らかとなっている一方で、なぜその官能基が重要なのか、までは明らかにされていない。そこで、本研究においては、*in vitro* の熱力学的解析および *in silico* でのドッキングシミュレーションを通して、カテキン類が有する官能基、特にガロイル基に焦点を当て、HSA への認識機構を明らかにすることとした。本研究を通して、HSA-カテキン間の相互作用特性を明らかとし、さらには、カテキン類と他分子の認識機構解明のための評価系の確立を行うこととした。Li らは、カテキン類の一種である (+)-Catechin と HSA との相互作用を、ITC を用いた熱力学的解析を行い、相互作用の特性として水素結合や van der Waals 力が相互作用の駆動力であることを明らかとしている³⁹。しかし、(+)-Catechin のみとの相互作用解析であることから、詳細な分子構造視点の議論ができていない。そこで、我々は、Figure 11 に示すように、様々なカテキン種およびその誘導体を用いることで、カテキン類のどの官能基が相互作用に重要かつ物理化学的にどのような特性を担っているかを明らかにすることとした。

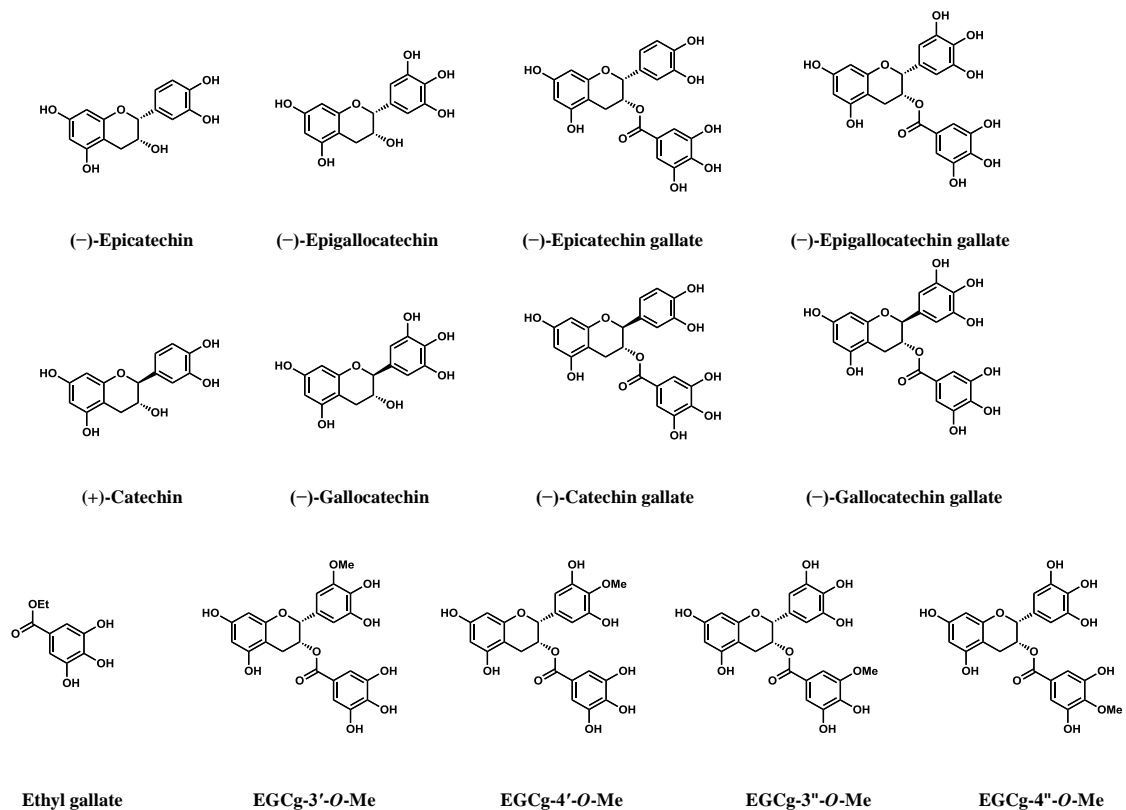


Figure 11. 実験に用いたカテキン種

2.3 HSA とカテキン類との相互作用解析手法

2.3.1 等温滴定型カロリメトリー測定 (ITC)

等温滴定型熱量測定 (Isothermal Titration Calorimetry; ITC) は熱力学パラメーターを溶液中で直接決めることができる唯一の物理化学的手法である。ITC の装置内部にはサンプルセルとリファレンスセルが備わっており、Figure 12(a)に示すように、任意の一定温度に保たれたサンプルセル中の標的分子溶液に対して、滴定シリンジ中のリガンド溶液を数マイクロリットルずつ逐次滴定された後、リガンドがサンプルセル内へ滴定されて両物質が相互作用することで、Figure 12(b)に示すような典型的な ITC データと等温滴定曲線が得られる⁴⁰。結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こる。リガンド滴定の進行に沿ってサンプルセル中の標的分子の結合サイトが飽和され、熱シグナルは減少して最終的にリガンドの希釈熱のみが観測されるようになる。各滴定の発生熱量をセル中におけるリガンドと標的分子のモル比に対してプロットすることにより結合等温線が得られ、カーブフィッティングとして、One-Set-of-Sites モデルを使用することで、ベストフィットカーブを算出する (Figure 12(b)、黒破線)。各フィッティングパラメータから、直接相互作用の結合定数 (K_A)、反応の結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)を求めることが出来る。それら値から、数式 (1)、(2) を用いることで、ギブズの自由エネルギー(ΔG)、解離定数 (K_D) およびエントロピー変化(ΔS)

を精度良く得ることができる。他の測定系と異なり、試料への化学修飾や物理的固定化等を必要とせず、自然状態に近い環境下で測定でき、1回の実験で分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを把握できることを特長とする。

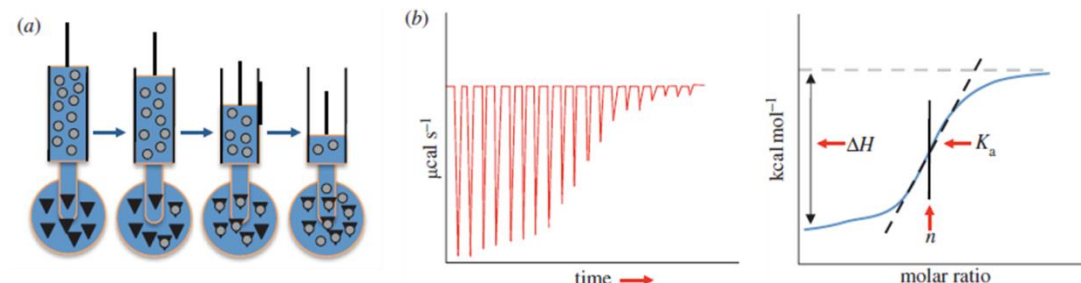


Figure 12. ITC の測定原理⁴⁰

(a)ITC の原理模式図、(b)ITC データ、等温滴定曲線、熱力学的パラメーターの算出模式図

$$\Delta G = -RT \ln K_A = \Delta H - T\Delta S \quad \dots (1)$$

$$K_D = 1/K_A \quad \dots (2)$$

本研究において、カテキン類-HSA 間の精密な相互作用解析を行う目的で ITC を使用することとした。以下に ITC を用いた詳細な解析手法について記述する。

2.3.1.1 カテキン類と HSA との相互作用解析

EGCg、ECg、GCg、Cg、EGC、EC、GC、C、Ethyl gallate およびメチル化 EGCg を 50mM リン酸バッファーに溶解し、HSA 濃度は 50 μ M、500 μ M のカテキン類、Ethyl gallate を 10 μ L ずつ 25 回の自動滴定、攪拌速度 307 rpm、温度 25 $^{\circ}$ C、滴定の持続時間 20 秒、滴定の間隔時間 180-240 秒で実験を行った。データ解析は、Origin 7 ソフトウェア (One-Set-of-Sites モデル) を用いた。

測定方法はセル側に HSA、シリンジ側にカテキン類、Ethyl gallate を入れ、自動滴定により、反応熱を見ることで親和性の算出を行った。その際、セル側に HSA を入れずに、セルにカテキン類、Ethyl gallate を入れた際に見られた熱を希釈熱として、セル側に HSA を入れた際に得られた反応熱から差引くことによって、HSA-カテキン類、Ethyl gallate のみの相互作用によって生じる反応熱とし、各種熱力学的パラメーターを算出した。

2.3.1.2 NaCl 存在下でのカテキン類 - HSA 間の相互作用解析

NaCl を添加することにより、蛋白質 - Ligand 間に働く正電荷、負電荷のような静電相互作用、特にイオン性相互作用を断ち切る働きがあり、両者間の結合に上記結合様式が関わっているか否かを検証することが可能となる⁴¹⁻⁴³。

EGCg、ECg、EGC、EC、Ethyl gallate を 50mM リン酸バッファーに溶解し、50 μ M HSA に

対して、500 μ Mのカテキン類、Ethyl gallateを10 μ Lずつ25回の自動滴定、攪拌速度307 rpm、温度25 $^{\circ}$ C、滴定の持続時間20秒、滴定の間隔時間180-240秒で実験を行った。データ解析は、Origin 7ソフトウェア（One-Set-of-Sitesモデル）を用いた。

測定方法はセル側にHSA、シリンジ側にカテキン類を入れ、両者に終濃度0.2Mとなるように調製したNaClを添加し、自動滴定により、反応熱を見ることで親和性の算出を行った。その際、セル側にHSAを入れずに、セルにカテキン類、Ethyl gallateを入れた際に見られた熱を希釈熱として、セル側にHSAを入れた際に得られた反応熱から差引くことによって、HSA-カテキン類、Ethyl gallateのみの相互作用によって生じる反応熱とし、各種熱力学的パラメーターを算出した。また、式(3)を用いて、NaCl無添加時の親和性と比較し、NaCl添加有無時の親和性の差分を算出した。

$$\text{親和性の差分} = \text{Log} (\text{NaCl 添加時の親和性} / \text{NaCl 無添加時の親和性}) \cdots (3)$$

2.3.1.3 サイトマーカー存在下でのEGCgまたはEGC-HSA間の相互作用解析

血栓塞栓症の治療薬であるwarfarinはHSAのサイトマーカーとして知られ、ドメインIIに存在するsite Iと言われる部位に結合することが知られている³²。そこで、warfarinとカテキン類との競合アッセイによるカテキン類の結合部位の推定を行った。

100 μ M HSAを12時間、4 $^{\circ}$ Cにて透析後、50 μ Mに調製し、10倍当量となるように、EGCgまたはEGCを添加し、HSA-EGCgまたはHSA-EGC複合体を調製した。その後調製した複合体溶液を測定セルに加えた。また、滴定シリンジには、500 μ M warfarinまたはibuprofen溶液を加えた。測定溶媒は、50mM Na-phosphate, 1% DMSO, pH 6.8を用い、測定は、10 μ Lごと25回の自動滴定、攪拌速度307rpm、温度25.0 $^{\circ}$ C、滴定の持続時間20秒、滴定の間隔時間180秒で実験を行った。測定毎に得られた熱量の総量を総熱量(ΔQ)とし、HSAとwarfarinまたはibuprofenとの相互作用に伴う総熱量とHSA-カテキン類複合体とwarfarinまたはibuprofenとの相互作用に伴う総熱量を比較することによって、warfarinまたはibuprofenとカテキン類が同一部位に結合するか否かの検証を行った。測定方法の概略図をFigure 13に示す。カテキン類とwarfarinがHSA内の同一部位に結合する場合、発熱が見られなくなることが考えられる。

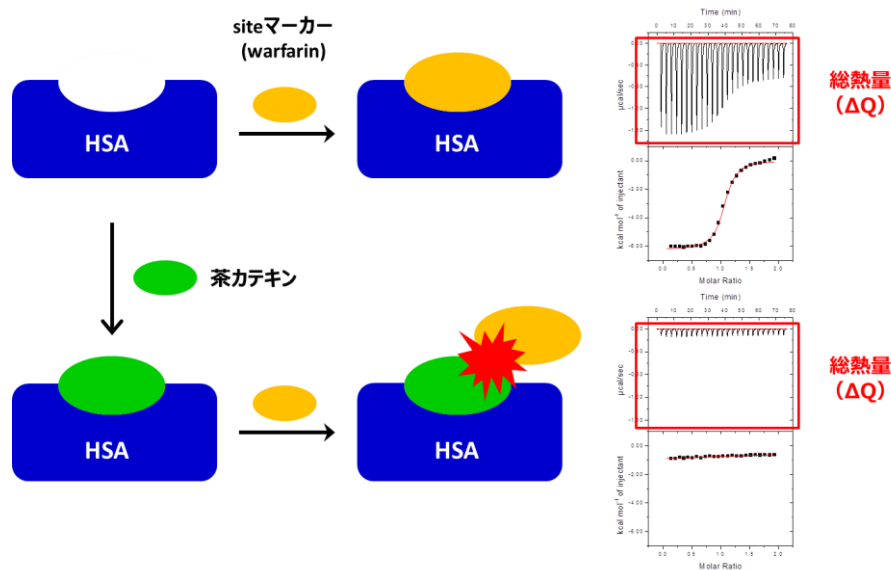


Figure 13. 測定方法、解析方法の概略図

2.3.2 示差走査型熱量測定 (DSC)

示差走査熱量測定 (DSC) は、試料の転移、融解、反応等の吸発熱現象が生じる温度およびその際の熱量を測定することができる。試料の入った試料セルとバッファーが入った基準セルを炉内で一定の昇温速度で加熱し、その際の時間に対する各セルの温度を計測する。その際の熱物性を温度差として捉え、炉の昇温速度と試料セル、バッファーセルの温度差を単位時間あたりに移動する熱量に変換する。試料セル内で転移や変性が生じると、バッファーセルに比べて試料セルで、発熱、吸熱を生じ、2つのセル間に温度差が生じる。この温度差を半導体熱伝導センサが検知し、温度差をゼロにするように、試料セルへ供給されている電力を増加または減少させる。この平衡維持のために入力されるフィードバック電力の変化を直接プロットすることで、転移などに生じた熱量を測定する。

HSA および HSA-カテキン類の複合体の熱安定性は VP-DSC (GE Healthcare, USA) を用いた熱量測定を用いて導いた。測定セルは、 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で $30\text{-}90^{\circ}\text{C}$ まで熱せられた。HSA の濃度は $50\mu\text{M}$ であり、カテキン類の濃度は $500\mu\text{M}$ とした。データ解析は、two-state model を用いた ORIGIN7 プログラムによって行われた。測定は3回行われ、その平均値を採用した。

2.3.3 NMR 法

NMR 法は測定した試料の化合物の化学構造や立体構造や分子内の運動性等の解析を行う最も適して手法の一つである。低分子と標的蛋白質との相互作用解析に用いることができることから、創薬研究における強力な解析ツールとなっている。

2.3.3.1 Saturation Transfer Difference (STD) 法

STD 法は近年、Meyer らによって開発された手法である⁴⁴。蛋白質選択的にラジオ波を照射し磁化を飽和させることで、蛋白質と相互作用結合しているリガンドに飽和を伝播させる。この際、蛋白質と相互作用している化合物のみに飽和移動が生じる一方で、相互作用していないリガンドについては飽和が伝播しない。この原理を利用し、飽和が伝播しているリガンドのスペクトルと伝播していないリガンドのスペクトルとの差をとることで、相互作用しているリガンドを特定することができる (Figure 14)⁴⁵。また、蛋白質との相互作用に関与するリガンド内の相互作用部位ほど、蛋白質からの磁化飽和が伝播しやすいという特性から、リガンド内の蛋白質との結合部位同定にも利用できるという利点がある。医薬品の探索、デザインおよび最適化など創薬分野では、アカデミアや企業研究において、すでに実用例がある⁴⁶⁻⁴⁹。本研究においては、HSA への EGCg の相互作用部位の同定を行うこととした。

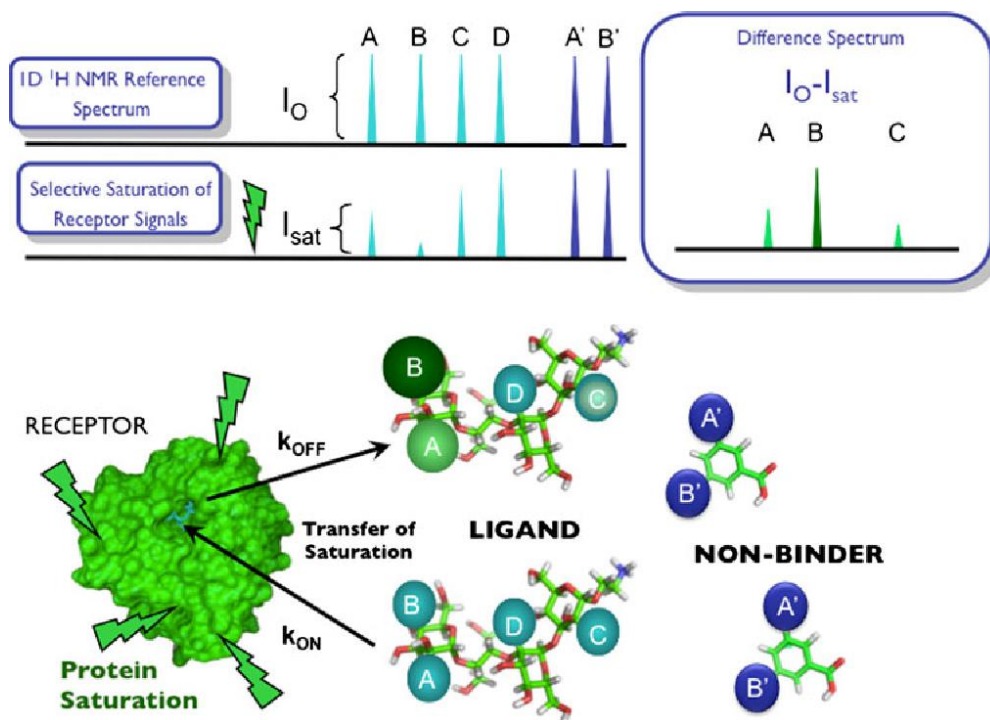


Figure 14. STD-NMR の原理 (模式図)⁴⁵

1 mM EGCg、20 μ M HSA となるように、15 mM K-phosphate buffer (pH 6.7)/ 90% H₂O、10% D₂O を用い調製した。飽和パルスの照射中心は-40ppm (off resonance)と 0ppm (on resonance) に設定し、パルスの照射時間は 1 秒で行った。装置は、Bruker AVANCE III HD、600 MHz NMR spectrometer、TCI cryogenic probe を用いて測定を行った。また、飽和パルスの照射時間を変化させた STD 測定を行った。式 (3) を用いて解析を行った。

$$\text{Intensity ratio} = (I_0 - I_{\text{sat}}) / I_0 \cdots (3)$$

I_0 : off resonance, I_{sat} : on resonance

2.3.3.2 Interligand NOEs for Pharmacophore Mapping (INPHARMA)

INPHARMA 法は、標的蛋白質のある同一表面に対して競合的に相互作用する 2 種類のリガンドの相互作用時の相対配向を明らかにする手法である。原理としては、蛋白質の水素核をある標的高分子に対して、2 種類の互いに競合阻害する リガンドが共存する場合、標的高分子を中継した 2 種類のリガンド間において、負の NOE の伝達が起こる (Figure 15)⁵⁰⁻⁵²。もし、一方のリガンドと標的蛋白質複合体の立体構造が既知の場合、もう一方のリガンドの標的分子への相互作用様式を推察することが可能となる。

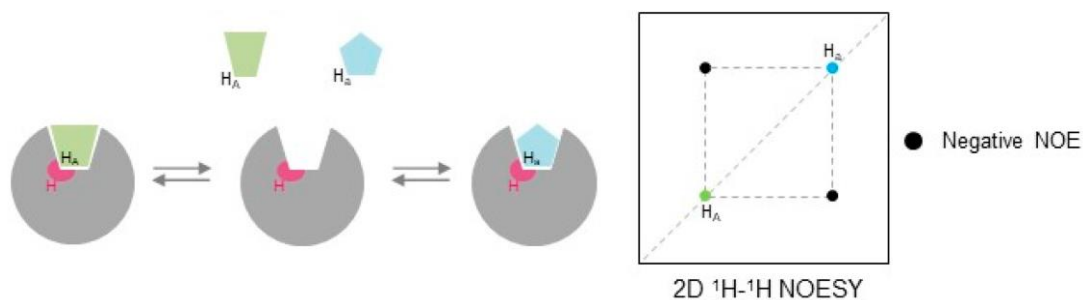


Figure 15. INPHARMA-NMR 法の模式図⁵²

本研究においては、前述のとおり、HSA への相互作用部位が既知である warfarin を相互作用既知物質として用い、EGCg の結合部位を検証することとした。2D NOESY での測定において、溶媒消去のパルス系列 (excitation sculpting) を使用したパルスプログラムを用いた。溶媒、試料の調製等は STD 法と同様の手法で行った。

2.3.4 計算化学 (ドッキングシミュレーション)

HSA-カテキン類、Ethyl gallate 間の相互作用の可視化、特性の検証を目的とし、ドッキングプログラムとして RosettaScripts および talaris2014 scoring function⁵³ を用い解析を行った。HSA の表面側鎖の自由度を持たせ、HSA の主鎖を固定した条件下で測定を行った。鋳型として、HSA (PDBID:1AO6) を用いて、カテキン類との複合体を作成した。カテキン類の立体配座発生手法としては、RDKit⁵⁴ を用い、50 個の立体配座を作成した。

2.3.4.1 Interface Score

HSA の site I および site II において、各カテキン類と HSA の複合体を 2000 個作成した。

モンテカルロ法を用いて、HSA-カテキン類、Ethyl gallate の複合体形成時のエネルギー、その際の蛋白質単体のエネルギーおよび Ligand のエネルギー計算をモンテカルロ極小化法を用いたエネルギー計算をすることで (Figure 16) ⁵⁵、HSA-Ligand 複合体の Interface score を算出した (式 (4))。

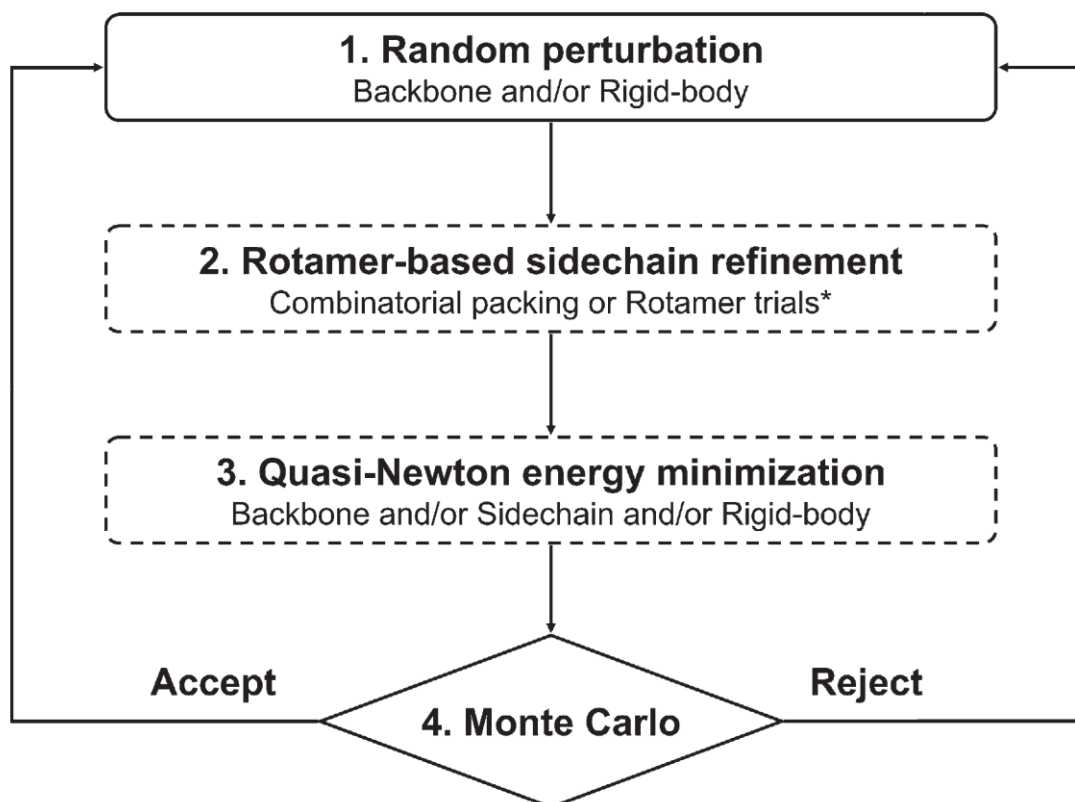


Figure 16. Rosetta モンテカルロ極小化法のスキーム ⁵⁵

$$\text{Interface Score} = S_{A-B} - S_A - S_B \cdots (4)$$

S_{A-B} : HSA-Ligand 複合体のエネルギー, S_A : HSA のエネルギー, S_B : Ligand のエネルギー

2.3.4.2 埋没表面積 (Buried surface area; BSA)

水分子を想定した 1.4 \AA のプローブ球を用いた露出面積は、溶媒接触面積 (Accessible surface area ; ASA) と呼ばれ、蛋白質の水和する水分子の数と相関が取れるため、水和エネルギーを見積もるのに使用されている。蛋白質-Ligand が結合する場合、新たに接触界面ができるため、各々が有する ASA が失われる。この接触界面は式 (5) によって算出される。ASA は、NACCESS program⁵⁶を用いて計算を行った。

$$\text{BSA} = \text{ASA}_A + \text{ASA}_B - \text{ASA}_{A-B} \cdots (5)$$

2.3.4.3 形状相補性 (Shape complementarity; S_c)

蛋白質-蛋白質間、蛋白質-Ligand 間相互作用などの分子認識の相補性において、重要な因子の 1 つに蛋白質表面の形状がある。Fischer らが提唱した酵素反応の「鍵と鍵穴モデル」⁵⁷のように、互いに形状があった分子同士には機能を発現するほどの高い親和性を有し、機能発現の場となることが知られている。そこで、Rosetta Libraries を用い、 S_c 法による形状相補性の計算を行った^{58, 59}。形状相補性は、蛋白質および Ligand の分子表面 (コノリ-面) から出た法線ベクトルの内積を求めることによって求められる。形状相補性が良い場合、内積は 1 に近づくことになる。HSA-Ligand 間の形状相補性を求めることにより、鍵と鍵穴のような関係か否かの検証を行った。

2.4 HSA とカテキン類との相互作用解析結果

2.4.1 ITC を用いた結合比、結合親和性、熱力学的パラメーターの取得

カテキン 8 種と HSA との ITC 測定結果を Figure 17、Table 1 に示す。すべてのカテキン類において、HSA と相互作用を示すことが明らかとなった。また、ガロイル基を有するカテキン類の方が、ガロイル基を有さないカテキン類よりも親和性が高いことが明らかとなった。このことは先行知見と同様の結果である。さらに、C 環の 2, 3 位の水酸基の立体異性体である *cis* 体は *trans* 体よりもガロイル基を有するカテキン類では親和性が高く、ガロイル基を有さないカテキン類では明確な差は見られなかった。その一方、B 環の水酸基の数の違いにおいては、ガロイル基を有するカテキン類においては水酸基の数が少ないカテコール体の方が親和性は高く、ガロイル基を有さないカテキン類においては明確な差は見られなかった。また、熱力学的パラメーターにおいては、親和性の高い EGCg、ECg は $\Delta H / \Delta G$ (%) が大きいことからエンタルピー駆動型の相互作用である一方で、その他のカテキン類においては、 $\Delta H / \Delta G$ (%) が小さいことからエントロピー駆動型の相互作用が HSA との結合様式として見られることが明らかとなった。また、ガロイル基を有するカテキン類は有さないカテキン類に比べて顕著に負にエンタルピーが大きく、相互作用を形成する結合が多いまたは相互作用面積が広いことが考えられ、HSA との相互作用において、構造内のガロイル基の重要性を示唆する結果である。8 種カテキン類の化学構造視点において、ガロイル基の有無、B 環の水酸基の数、*cis/trans* 体の違いによって結合様式、結合親和性などが異なるということを示唆する結果が得られた。

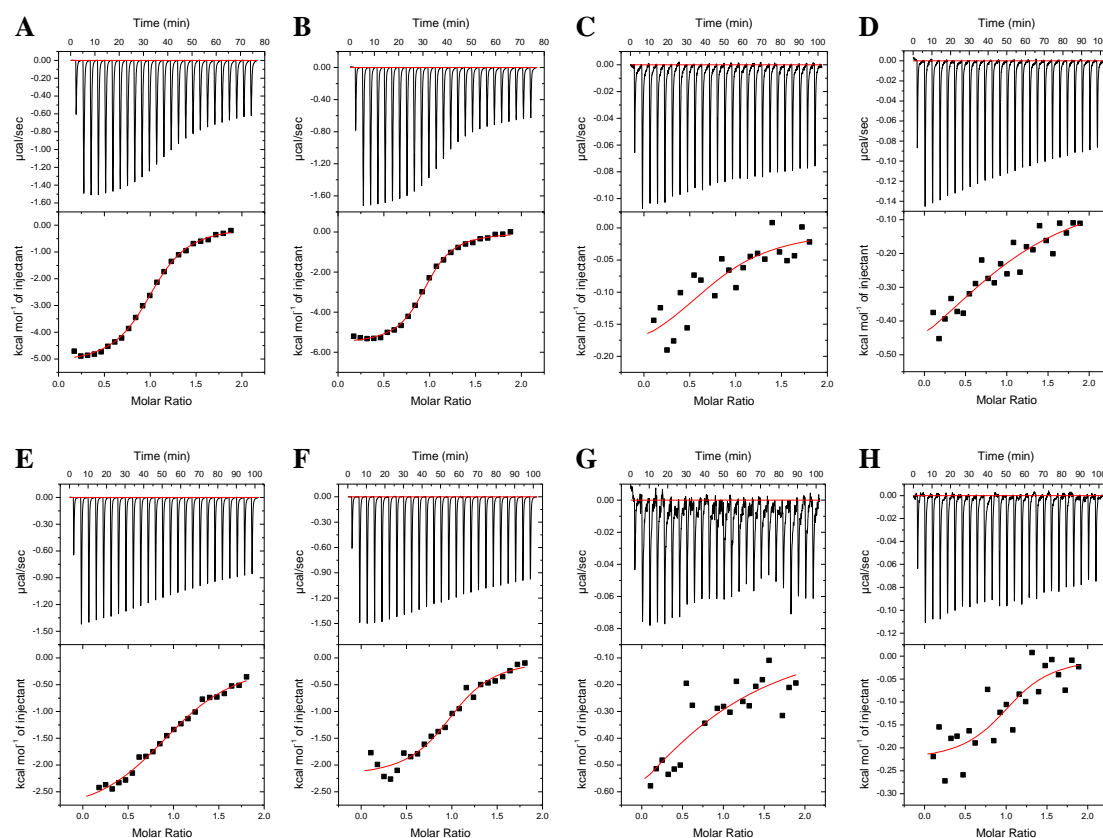


Figure 17. 8種カテキン類とHSAとの相互作用に伴う熱力学的解析結果
 (A) EGCg, (B) ECg, (C) GCg, (D) Cg, (E) EGC, (F) EC, (G) GC, (H) C

Table 1. ITCによる8種カテキン類とBSAとの相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	$\Delta H/\Delta G(\%)$	N
EGCg	2.2 ± 0.3	-4.7 ± 0.6	-3.0 ± 0.6	-7.7 ± 0.1	61	1.1 ± 0.1
ECg	1.1 ± 0.1	-5.1 ± 0.5	-3.1 ± 0.5	-8.1 ± 0.1	63	1.0 ± 0.1
GCg	8.8 ± 3.4	-3.0 ± 0.1	-3.9 ± 0.3	-6.9 ± 0.2	43	1.2 ± 0.2
Cg	3.5 ± 0.5	-2.8 ± 0.6	-4.6 ± 0.7	-7.4 ± 0.1	38	1.0 ± 0.1
EGC	20 ± 16	-0.6 ± 0.4	-5.8 ± 0.7	-6.3 ± 0.4	10	1.0 ± 0.2
EC	49 ± 18	-0.8 ± 0.2	-5.1 ± 0.4	-5.8 ± 0.2	13	1.0^a
GC	52 ± 16	-1.1 ± 0.5	-4.7 ± 0.7	-5.8 ± 0.2	19	1.0^a
C	5.0 ± 8.6	-0.3 ± 0.1	-6.8 ± 0.7	-7.1 ± 0.5	4	1.0 ± 0.2

a) 親和性が低いため、結合比 N を 1 と仮定した結果

ガロイル基の有無の違いにより、親和性、熱力学的パラメーターに差が見られたことから、ガロイル基の誘導体である Ethyl gallate-HSA 間の相互作用を解析した。測定結果を Figure 18、Table 2 に示す。カテキン類同様に、Ethyl gallate は HSA と相互作用することが明らか

となった。その一方で、ガロイル基を有するカテキン類においては、エンタルピー得である結果が得られたが、Ethyl gallate との相互作用においては、 $\Delta H/\Delta G$ (%) が小さく、エントロピー駆動型の相互作用であることが明らかとなった。その一方で、ガロイル基を有さない化合物に比べ、エントロピー得であることから、ガロイル基部位は、エンタルピー得に重要な官能基である一方で、ガロイル基が結合する母骨格の立体構造が親和性、熱力学パラメーターを決める因子であることを見出した。

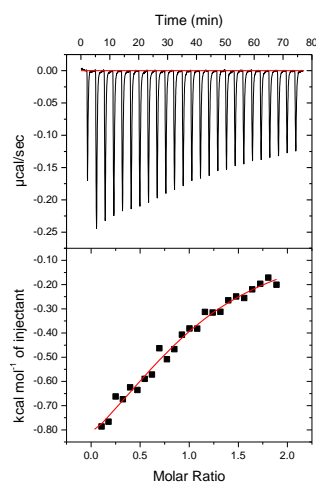


Figure 18. Ethyl gallate-HSA 間の相互作用に伴う熱力学的解析結果

Table 2. Ethyl gallate と HSA との相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	$\Delta H/\Delta G$ (%)	N
Ethyl gallate	46 ± 23	-1.4 ± 0.1	-4.5 ± 0.4	-5.9 ± 0.3	31	1.0^a

a) 親和性が低いため、結合比 N を 1 と仮定した結果

ガロイル基の有無によって相互作用の駆動力に違いがみられたことから、より詳細に相互作用の特性、特に結合様式について検証することとした。一般的に、2 者間の相互作用を検証する際、両者に働く駆動力の違いにより系中の塩濃度に対する親和性への影響が異なることが知られている。具体的には、2 者間の相互作用において、疎水性相互作用が駆動力ならば、塩濃度を上げた際に親和性が向上し、静電相互作用が駆動力ならば、塩濃度を上げた際に親和性が低下することが知られている^{41, 43, 60}。そこで、カテキン類と HSA との相互作用解析時に 0.2 M の NaCl を添加し、親和性の検証を行った (Figure 19, Table 3)。その結果、ガロイル基をもつカテキン類において、親和性が低下つまり、静電相互作用が駆動力であり、ガロイル基を持たないカテキン類、およびガロイル基の類縁体においては疎水性相互作用が駆動力であることが明らかとなった。

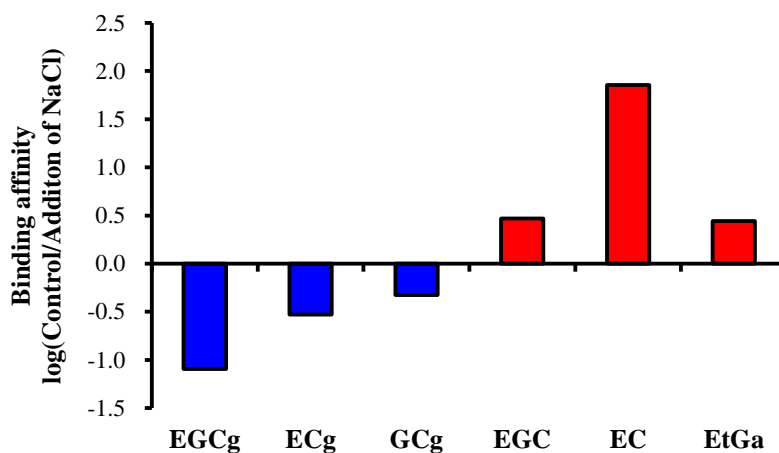


Figure 19. NaCl 添加有無での HSA-カテキン類の親和性の比較

Table 3. NaCl 添加有無時の HSA-カテキン類の親和性

Compound	EGCg		ECg		GCg		EGC		EC		EtGa	
	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2	0	0.2
K_D (μM)	2.2	27.3	1.1	3.7	8.8	18.6	19.5	6.7	48.7	0.7	45.7	16.6

そこで、EGCg の B 環およびガロイル基の水酸基の水素がメチル化された誘導体 (Figure 4) を用いて、さらに、カテキン類の HSA への相互作用の官能基特性を検証することとした。その結果を Figure 20 および Table 4 に示す。すべてのメチル化 EGCg において、HSA と相互作用を示すことが明らかとなった。また、すべてのメチル化 EGCg において、エンタルピー得がみられた一方で、B 環の水酸基をメチル化した EGCg-3'-O-Me、EGCg-4'-O-Me においてはエントロピー損が生じたため、親和性の向上がほとんど見られなかった。その一方で、ガロイル基の水酸基をメチル化した EGCg-3''-O-Me、EGCg-4''-O-Me においては、エントロピー損を生じるがそれ以上にエンタルピー得を生じたため、親和性も向上した。特に EGCg-3''-O-Me においてはその影響が顕著であった。上記の結果から、ガロイル基が主に相互作用特に親和性獲得に関与していることが明らかとなった。

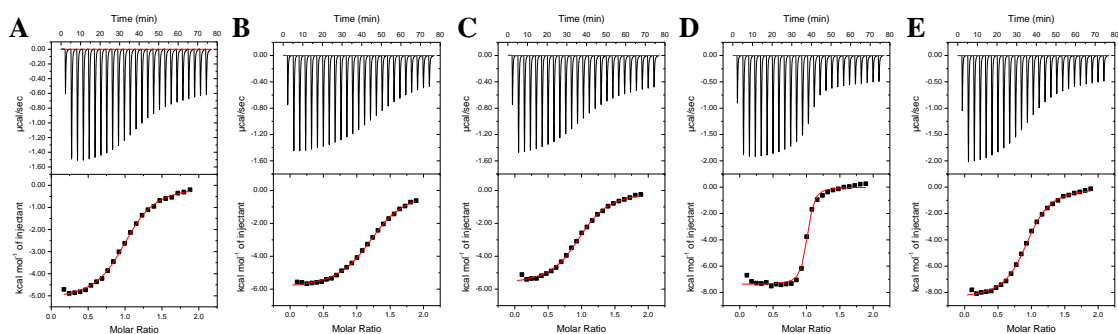


Figure 20. EGCg およびメチル化 EGCg - HSA 間の相互作用に伴う熱力学的解析結果 (A) EGCg, (B) EGCg-3'-O-Me, (C) EGCg-4'-O-Me, (D) EGCg-3''-O-Me, (E) EGCg-4''-O-Me

Table 4. EGCg およびメチル化 EGCg - HSA 間の相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	$K_D(\mu\text{M})$	$\Delta H(\text{kcal mol}^{-1})$	$-T\Delta S(\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta G(\text{kcal mol}^{-1})$	N
EGCg	2.2 ± 0.3	-4.7 ± 0.6	-3.0 ± 0.6	-7.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1
EGCg-3'-O-Me	1.6 ± 0.2	-9.3 ± 0.4	1.4 ± 0.3	-7.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
EGCg-4'-O-Me	1.7 ± 0.1	-7.0 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	-7.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
EGCg-3''-O-Me	0.14 ± 0.02	-7.9 ± 0.9	-1.4 ± 0.9	-9.4 ± 0.1	1.0 ± 0.1
EGCg-4''-O-Me	1.0 ± 0.1	-9.8 ± 0.1	1.6 ± 0.1	-8.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1

また、ガロイル基内の水酸基の H を CH_3 に置換した際、熱力学的パラメーターが変化した要因として、EGCg と比べメチル化 EGCg の物性変化が影響しているものと考えられる。フェノールよりもそのメチル化体であるアニソールの方が、 $\log P$ 値が大きいことが知られている⁶¹。つまり疎水性であると言える。また、水酸基に比べてメトキシ基の方が電子供与性基であり、電子密度が大きい。つまり、相互作用相手との相互作用面が大きくなる可能性があり、van der Waals 相互作用などを生じやすくなり、エンタルピー得が生じることが考えられる。この仮説を検証するため、最も親和性が向上した、EGCg-3''-O-Me を用いて、HSA との相互作用時に生じる ΔC_p を計算した。 ΔC_p は蛋白質-リガンド間の相互作用面の大きさと相関があることが知られており、より負に大きな値を示すほど、大きな相互作用面を有するということを意味する^{62,63}。HSA-EGCg および HSA-EGCg-3''-O-Me 間の ΔC_p を Figure 21、Table 5 に示す。それぞれ $-0.18 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ および $-0.29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であり、HSA-EGCg-3''-O-Me 間の ΔC_p は負に大きいことから、仮説通りガロイル基の水酸基をメチル化することによって相互作用面を稼ぎ、エンタルピー得かつ親和性を向上させることを明らかとした。

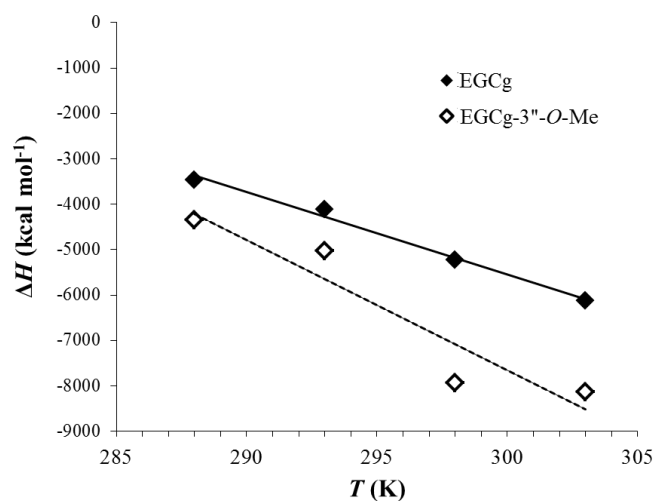


Figure 21. 各温度における ΔH のプロット
(◆HSA-EGCg、◇HSA-EGCg-3''-O-Me)

Table 5. 各温度での HSA-EGCg、HSA-EGCg-3''-O-Me 間相互作用の熱力学的パラメーター

Compound	Temperature (K)	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	N	ΔC_p ($\text{kcal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)
EGCg	288	2.2	-3.5	-4.0	-7.4	1.1	-0.18
	291	2.1	-4.1	-3.5	-7.6	1.1	
	298	2.1	-5.2	-2.5	-7.7	1.0	
	303	3.1	-6.1	-1.5	-7.6	1.0	
EGCg-3''-O-Me	288	0.2	-4.3	-4.6	-8.9	1.2	-0.29
	291	0.1	-5.0	-4.3	-9.3	0.9	
	298	0.1	-7.4	-2.1	-9.5	1.0	
	303	0.2	-8.1	-1.2	-9.3	1.1	

ITC を用いたカテキン類と HSA との相互作用解析結果から、カテキン類は、ガロイル基の有無により異なる結合様式で HSA を認識し、ガロイル基が親和性向上に優位に働いていることが明らかとなった。

2.4.2 DSC を用いた HSA-カテキン類の相互作用による HSA の熱安定性評価

蛋白質に結合する Ligand 共存下では、蛋白質が Ligand と複合体を形成することで、熱安定性が向上することが知られている⁶⁴。水溶液中の蛋白質は天然状態と変性状態の 2 状態間の平衡で存在する。DSC を用いることで、蛋白質の昇温過程における立体構造変化に由来する熱の出入りを検出することができる。DSC を用いて蛋白質に時間依存的に熱負荷をかけることで、天然状態から蛋白質溶液を昇温させ、生じる立体構造の自由度が増大するこ

とで、安定化に寄与している様々な因子が弱められ、熱変性が引き起こされる。蛋白質の熱変性に伴う ΔH は吸熱のピークとして現れ、その吸熱ピークの中点、つまり半分の蛋白質が変性した温度を熱変性中点 (T_m) と呼ぶ。 T_m は蛋白質の熱安定性を評価する 1 つの指標であり、 T_m が高い分子は低い分子と比較して熱に安定な蛋白質であると言える。つまり、Ligand が結合した複合体においては、 T_m が上昇する。模式図を Figure 22 に示す。黒線が蛋白質のみの結果であり、赤線が蛋白質 - Ligand 複合体の結果である。HSA においては、リガンドが結合した HSA は結合していない状態と比べて、熱安定性が高いことがすでに知られている⁶⁵。これまでの検討からカテキン類が HSA と相互作用することが明らかとなった。HSA とカテキン類が相互作用することから、蛋白質を安定化することが期待できる。そこで、HSA-カテキン類の複合体の熱安定性を検証することとした。その結果を Figure 23、Table 6 に示す。HSA のみおよびカテキン類 8 種の HSA 複合体について熱安定化効果の検証を行った。HSA の T_m に対して HSA-カテキン類の T_m の差分である ΔT_m を算出したところ親和性の指標である K_D と相関が見られ (Pearson の相関係数 $R = 0.52$)、相互作用することによって HSA を安定化していることが明らかとなった。また、ガロイル基を有するカテキン類とガロイル基を有さないカテキン類とで、熱安定性への影響が顕著に異なることが明らかとなった。この結果から、カテキン類特にガロイル基を有するカテキン類は相互作用することで、蛋白質安定化効果を有し、蛋白質の保護剤としての作用があることが明らかとなった。また、ITC とは異なる測定原理においても相互作用を客観的に評価できる技術を獲得した。

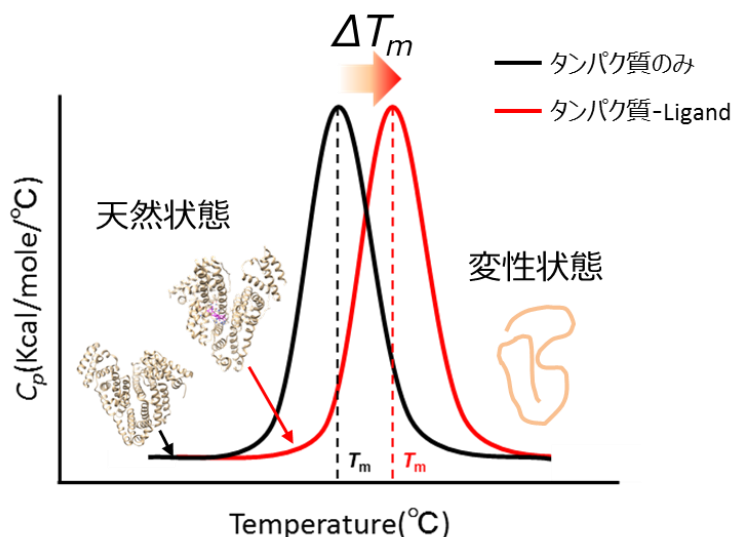


Figure 22. 蛋白質の熱安定性測定

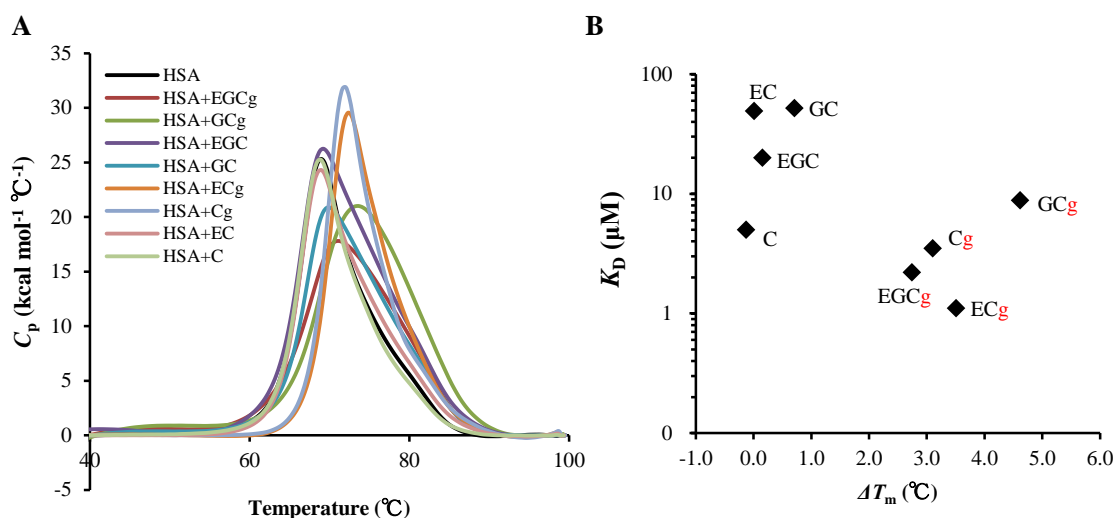


Figure 23. HSA-カテキン類の DSC 測定結果
(A)DSC 測定結果、(B)親和性と ΔT_m の相関図

Table 6. HSA および HSA-カテキン類の熱安定性および親和性

Sample	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)	K_D (μM)
HSA	68.6 ± 0.1	—	—
HSA-EGCg	71.4 ± 0.3	2.7	2.2 ± 0.3
HSA-ECg	72.2 ± 0.1	3.5	1.1 ± 0.1
HSA-GCg	73.3 ± 0.1	4.6	8.8 ± 3.4
HSA-Cg	71.7 ± 0.1	3.1	3.5 ± 0.5
HSA-EGC	68.8 ± 0.2	0.2	20 ± 16
HSA-EC	68.7 ± 0.3	0.0	49 ± 18
HSA-GC	69.3 ± 0.1	0.7	52 ± 16
HSA-C	68.5 ± 0.1	-0.1	5.0 ± 8.6

2.4.3 HSA へのカテキン類の結合部位の検証

これまでの検討から、カテキン類は HSA に対して相互作用することが明らかとなったが、HSA のどの部位に結合するかについても両者間の相互作用を理解するという意味では重要である。そこで、HSA との結合部位が既知である warfarin とカテキン類との ITC を用いた競合阻害実験および、NMR を用いた STD 法および IMPHARMA 法による結合部位の道程の同定を行った。

2.4.3.1 ITC を用いた競合阻害実験

ITC を用いた、EGCg、EGC および warfarin の競合アッセイの結果を Figure 24、25 に示す。EGCg および EGC とともに warfarin と競合することが明らかとなった。つまり、warfarin は HSA の sub-domain II の site I に結合することが知られていることから³²、カテキン類も同一の部位に結合すると考えられる。EGCg-HSA 複合体は EGC-HSA 複合体に比べ総熱量が小さい結果となった。この要因としては、EGCg が EGC よりも HSA への親和性が高いことから、warfarin の HSA への相互作用を EGC よりも効率よく阻害していることが要因と考察できる。

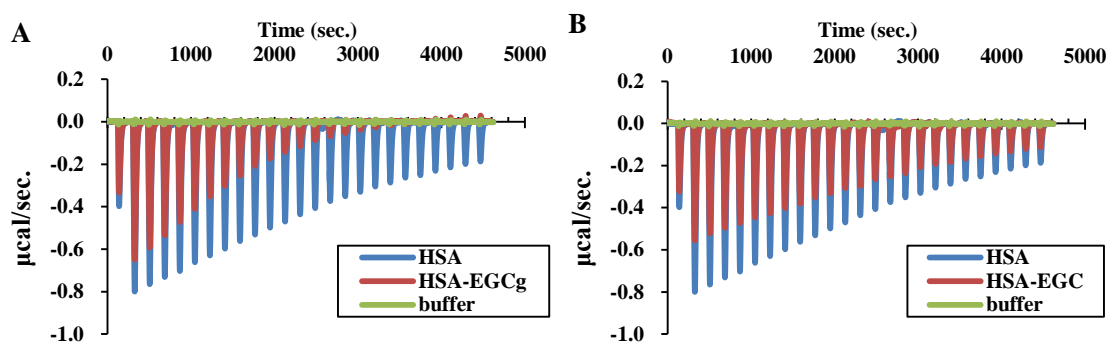


Figure 24. ITC による競合阻害実験の結果 (A) EGCg、(B)EGC

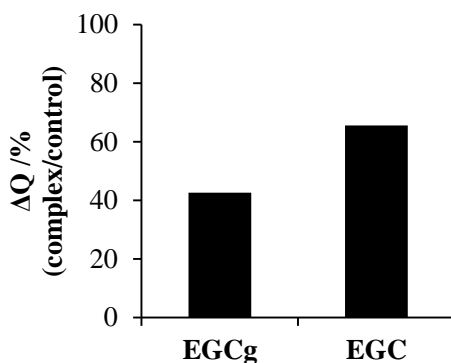


Figure 25. 競合阻害実験時の総熱量

warfarin と同様に HSA に結合する薬物として、ibuprofen がある。ibuprofen は warfarin と異なる site II に結合することが知られている³²。そこで、EGCg が site II に結合するか否かを ibuprofen との競合阻害実験を行うことで明らかにすることとした。本検証は、ITC を用いて、warfarin と同様に HSA-EGCg 複合体を cell に入れ、syringe に ibuprofen を入れ、ibuprofen を滴下した際の測定時の反応熱を指標に検証することとした。その結果、ibuprofen は warfarin を滴下した際にみられた反応熱の阻害がほとんど見られないことが明らかとなった (Figure 26)。つまり、EGCg と ibuprofen は競合せず、結合サイトは site II ではないことを示唆する結果が得られた。

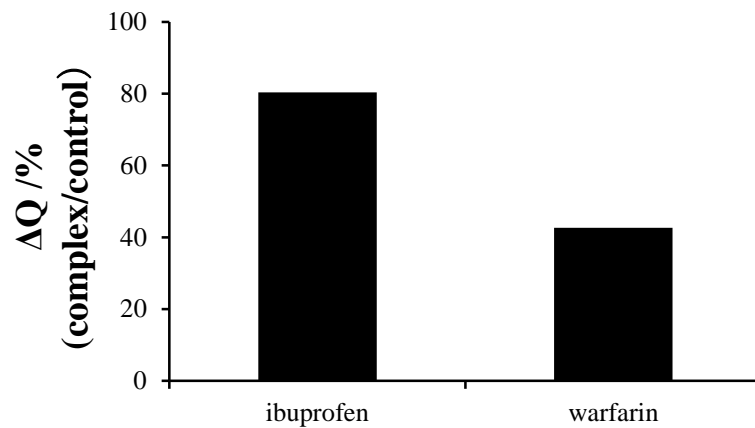


Figure 26. 競合阻害実験時の総熱量

2.4.3.2 NMR を用いたカテキン類の HSA 結合部位の同定

2.4.3.2.1 STD 法を用いた HSA-EGCg の相互作用解析

溶液 NMR 法による相互作用解析を行った。まず、EGCg のみの ^1H NMR を測定し、EGCg の各プロトンの帰属を行った (Figure 27)。

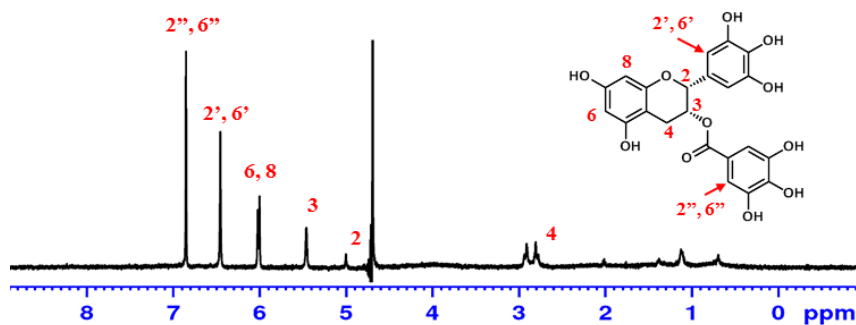


Figure 27. EGCg の ^1H NMR

Saturation Transfer Difference (STD) 法による解析を行った。その結果、EGCg の A 環、B 環、ガロイル基のそれぞれの ^1H について大きな STD が観測された (Figure 28)。これは EGCg が分子全体で HSA と相互作用していることを示唆している。

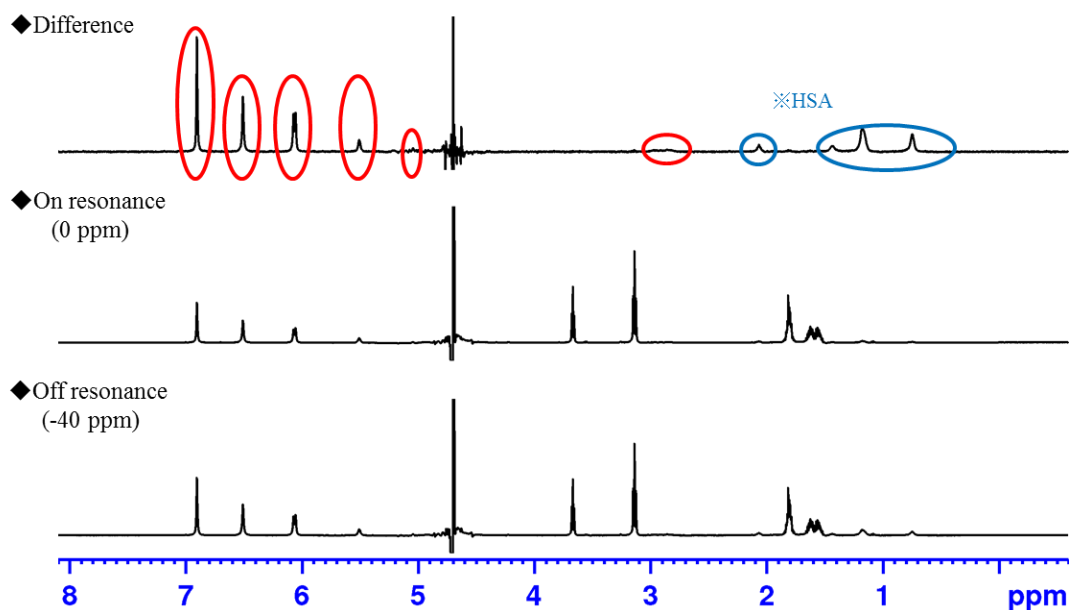


Figure 28. STD 実験の NMR スペクトル

より詳細な解析を行うため、EGCg と HSA の混合溶液を用いて、飽和パルスの照射時間を変化させた STD 測定を行った。具体的には、STD の飽和パルスの照射時間を変更してそれぞれのピークの STD スペクトルの強度の比較を行った。カテキンの官能基ごとに帰属する代表的なプロトンにて比較を行ったところ、A 環、B 環、ガロイル基ともに同様の傾向を示し、各プロトンにおける差がみられなかった (Figure 29)。このことから、EGCg が分子全体で HSA と相互作用していることを示唆している。

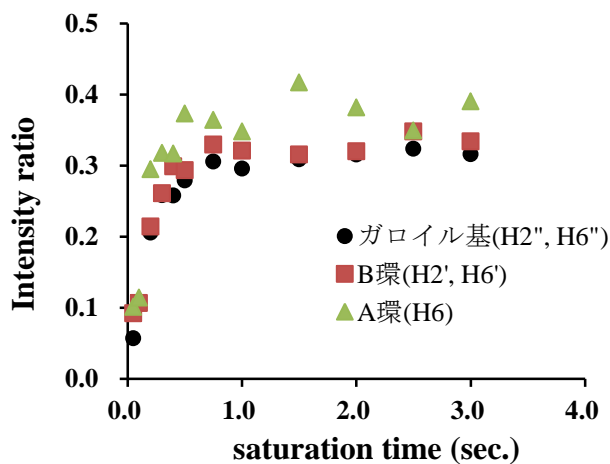


Figure 29. EGCg の化学構造に由来する STD スペクトルの強度比較

EGCg は HSA の site I に結合することが ITC の競合阻害実験から示唆されている。site I は warfarin などと結合できるポケット様構造であることが知られている (Figure 30) ⁶⁶。

warfarin は HSA との共結晶構造からポケットに入り込む形で結合していることが知られており³²、EGCg も同様に結合することが考えられる。STD 法によって EGCg は HSA に対して分子全体で結合することが示唆され、この結果は、warfarin 同様、site I に入り込んでいることが考えられる。

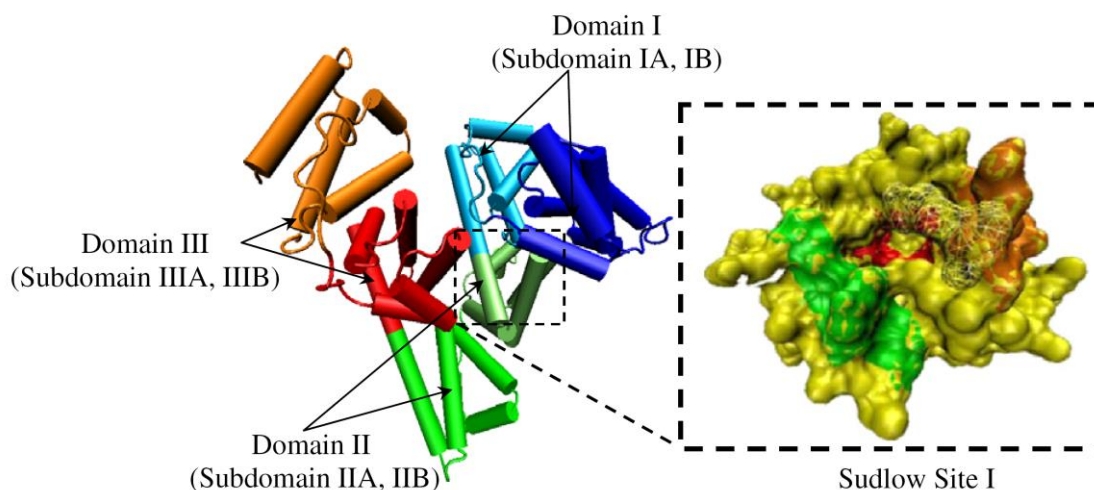


Figure 30. HSA の site I の構造

2.4.3.2.2 INPHARMA 法による EGCg の HSA 結合部位の解析

INPHARMA 法を用いて、HSA の site I に結合することが知られている warfarin と EGCg が同一の site に結合するかどうかの検証を行った。まず、STD 法同様に、warfarin の ^1H NMR を測定し、warfarin の各プロトンの帰属を行った (Figure 31)。

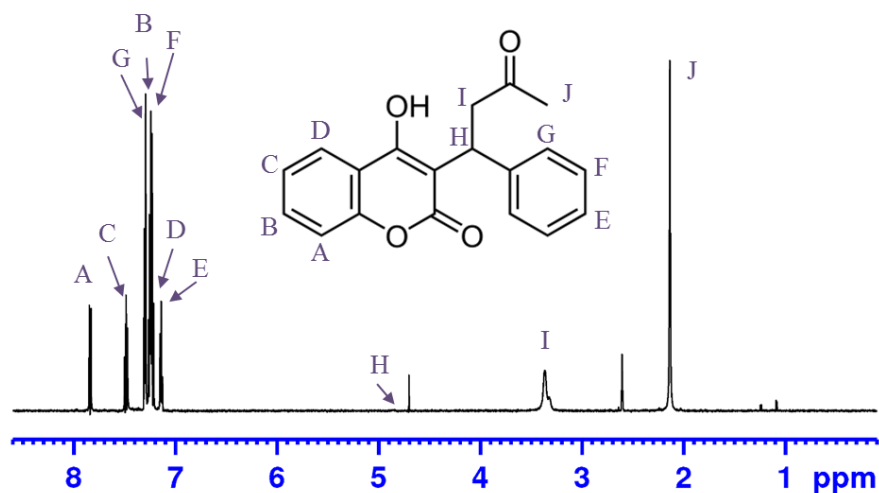


Figure 31. Warfarin の ^1H NMR

続いて、2D ^1H - ^1H NOESY 測定による INPHARMA NOE の検出を行った。その結果、EGCg および warfarin に HSA を介した NOE である interligand NOEs が検出された (Figure 32)。EGCg

の 2', 6' と warfarin の E, G, F の間に比較的大きな INPHARMA による分子間 NOE ピークが観測された。さらに、EGCg の 2', 6' および 2'', 6'' と warfarin の J (メチル基) の間に分子間 NOE ピークが観測された。EGCg は INPHARMA 測定において、warfarin との分子間 NOE が観測されることから同じ部位に結合していると考えられる。

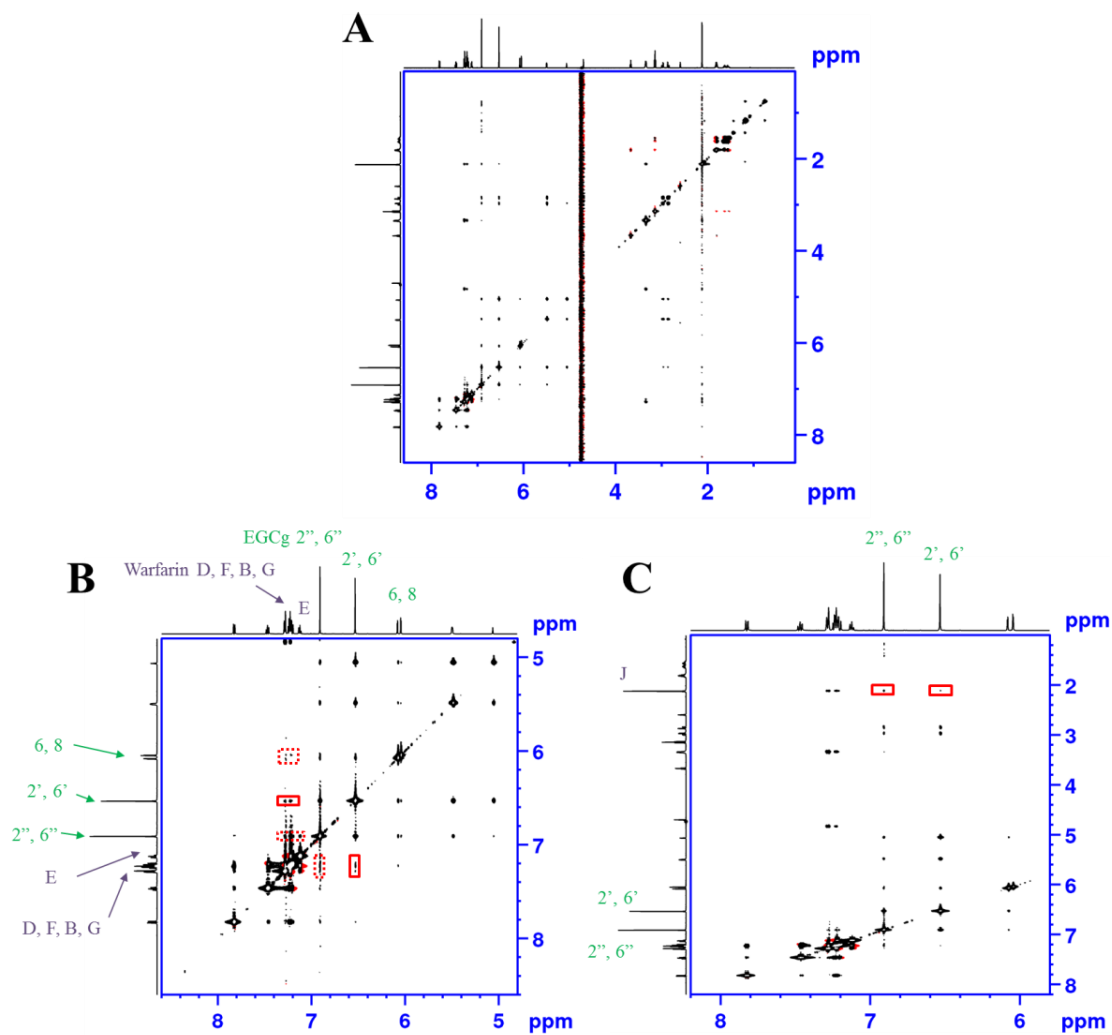


Figure 32. HSA と EGCg および warfarin 混合物の 2D NOESY スペクトル

つまり、EGCg の 2', 6' と warfarin のベンゼン環およびメチル基 (Figure 33、オレンジ枠) の間に分子間 NOE ピークが観測されることから、複合体中でオレンジ枠の領域に近い位置に、EGCg の B 環が位置していると予想される。つまり、HSA の site I に EGCg が結合していることが明らかとなった。この結果は ITC を用いた競合阻害実験とも一致する結果であった。

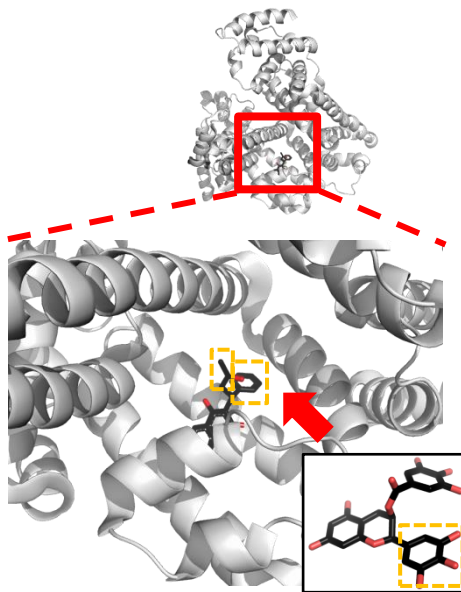


Figure 33. INPHARMA 測定からの EGCg の相対方位
 ※HSA-warfarin 複合体の結晶構造 (PDB :2BXD)

2.4.4 *in silico* による HSA-カテキン類の相互作用解析

ITC、DSC および NMR を用いた測定結果より、HSA とカテキン類は相互作用し、特に EGCg は HSA の site I に結合することが明らかとなった。そこで、カテキン類と HSA の複合体をドッキングソフト Rosetta を用いて作成し、site I にカテキン類を結合させた際の HSA-カテキン複合体のエネルギー安定性の検証を行うことで、原子レベルでの相互作用情報を得るとともに、EGCg 以外のカテキン類の結合部位、相互作用情報についての考察を行った。

2.4.4.1 HSA-Ligand 間の Interface Score

各カテキン類に対して、HSA との複合体を 2000 個作成し、エネルギー安定性の高い上位 10 個の複合体のエネルギー平均値と熱力学測定によって得られた親和性の指標である ΔG の値との相関性を検証した。その結果を Figure 34、Table 7 に示す。カテキン 8 種、Ethyl gallate およびメチル化 EGCg と HSA の相互作用に伴う ΔG の値と各 HSA との複合体のエネルギー値に大きな相関性があることが明らかとなった (Pearson の相関係数 $R = 0.90$)。この結果から、カテキン類の相互作用部位としては、site I と考えられ、予測精度の高い HSA-カテキン複合体モデルが作成されたと考えることができる。

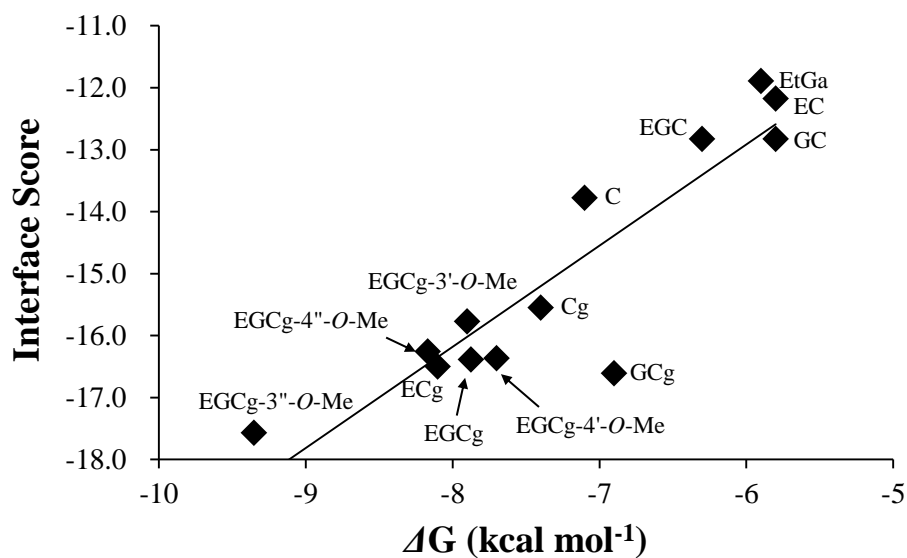


Figure 34. ΔG *in vitro* と interface score *in silico* との相関図 (site I)

Table 7. 各カテキン類-HSA 間相互作用における ΔG *in vitro* と interface score *in silico*

Compound	ΔG (kcal mol ⁻¹)	Interface Score
EGCg	-7.7	-16.37
ECg	-8.1	-16.50
GCg	-6.9	-16.61
Cg	-7.4	-15.55
EGC	-6.3	-12.83
EC	-5.8	-12.18
GC	-5.8	-12.83
C	-7.1	-13.78
Ethyl gallate	-5.9	-11.89
EGCg-3'-O-Me	-7.6	-15.77
EGCg-4'-O-Me	-7.6	-16.39
EGCg-3''-O-Me	-9.5	-17.57
EGCg-4''-O-Me	-7.9	-16.26

以上の結果より、カテキン類は、HSA の site I に特異的に結合することを示唆する結果が得られた。HSA には site I の他に、ibuprofen が結合する site II が存在する。site II へカテキン類の結合性を検証するため、site II でのドッキングシミュレーションを行った。その結果、site I のドッキングシミュレーションの方が site II への interface score と ITC 測定によって得

られた ΔG との相関性が良好であり、カテキン類は site I に結合することがより有利であることを示唆する結果が得られた (Figure 35)。このことは、カテキン類が site I に結合することを示す競合阻害実験の結果と一致した。

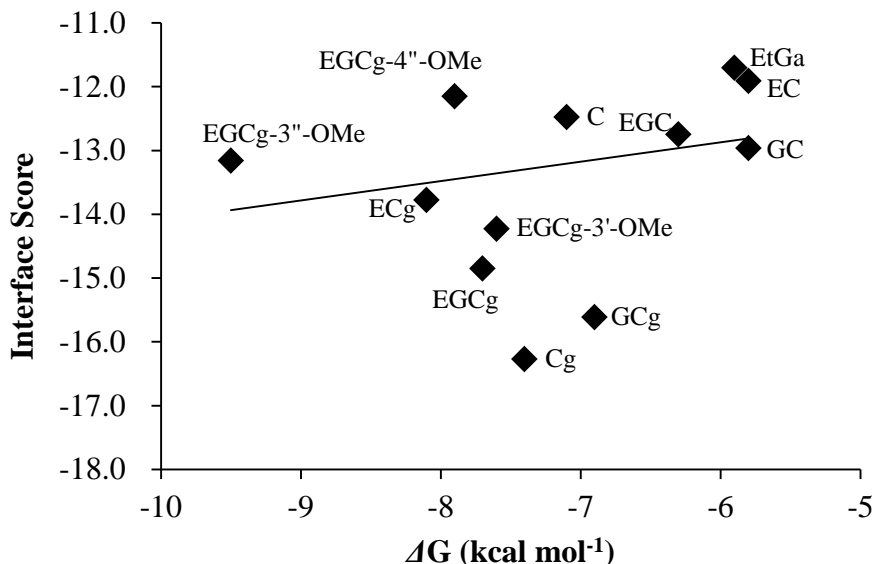


Figure 35. ΔG *in vitro* と interface score *in silico* との相関図 (site II)

2.4.4.2 HSA-Ligand 間の埋没表面積 (BSA)

予測精度の高い複合体モデルが作成されたことから、両者間の相互作用特性についての解析も行うこととした。作成した HSA の site I に結合したカテキン類と HSA のモデル複合体の構造における埋設表面積 (BSA) 計算を行った。その結果、ガロイル基を有するカテキン類はガロイル基を欠くカテキン類よりも大きな BSA を有することが明らかとなった。また、BSA と ITC によって導き出した ΔG との間に高い相関性が見られた ($R = 0.82$, Figure 36)。

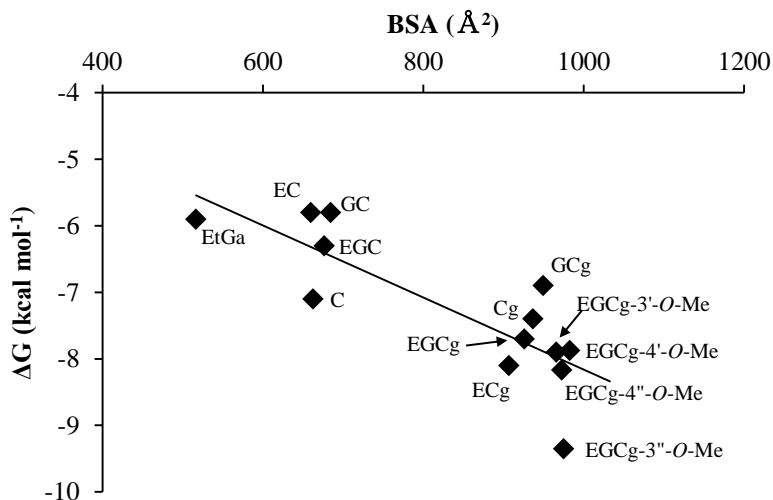


Figure 36. ΔG *in vitro* と BSA *in silico* との相関図

2.4.4.3 HSA-Ligand 間の形状相補性 (S_c)

HSA-Ligand 間の形状相補性 (S_c) を検証したところ、ITC によって導き出された ΔG と高い相関性を示した ($R=0.76$ 、Figure 37)。特に EGCg およびガロイル基のメチル化誘導体は、他のカテキン誘導体よりも大きな形状相補性 (S_c) を示した。

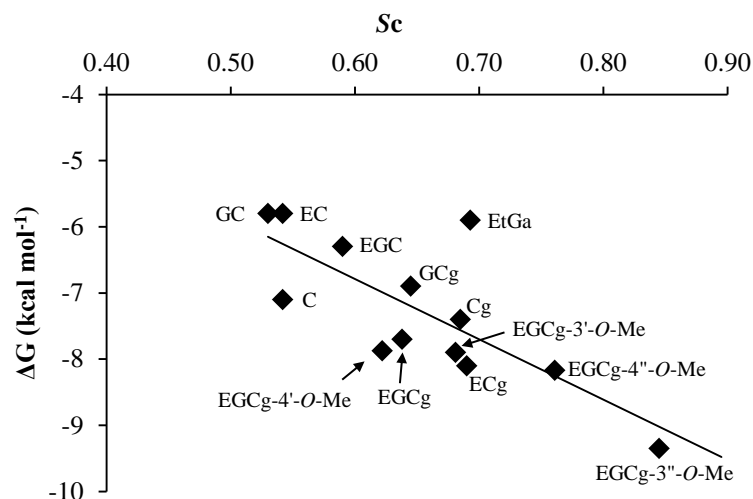


Figure 37. ΔG *in vitro* と S_c *in silico* との相関図

宇野らは、シガトキシン抗体 10C9 の抗原抗体相互作用を解析した結果、抗体が有する抗原結合ポケットとの形状相補性が高い抗原では、より多くの非共有結合形成によるエンタルピー得が見られ、高い親和性を獲得していることを明らかとしている⁶⁷。そこで、以下にて、*in silico* のドッキングスコアの物理項目をより詳細に解釈することとした。

2.4.4.4 HSA-Ligand 間相互作用の熱力学パラメーター (*in silico*)

まず、ドッキングシミュレーションから得られた HSA-EGCg 複合体のモデルを Figure 38 に示す。Kyte-Doolittle スケール⁶⁸を用いた疎水性マッピングは、HSA の site I が無極性領域と極性領域の両方を有することを示唆している。また、EGCg のガロイル基が、site I の分子表面と水素結合および十分に詰まったファンデルワールス接触を形成することを可能にすることを示している (Figure 38)。したがって、これらの結果は、カテキン類のガロイル基が、主に HSA の site I の無極性および極性表面と十分に詰まったファンデルワールス相互作用による BSA および形状相補性を増加させることによって HSA との結合親和性を増加させることを示している。

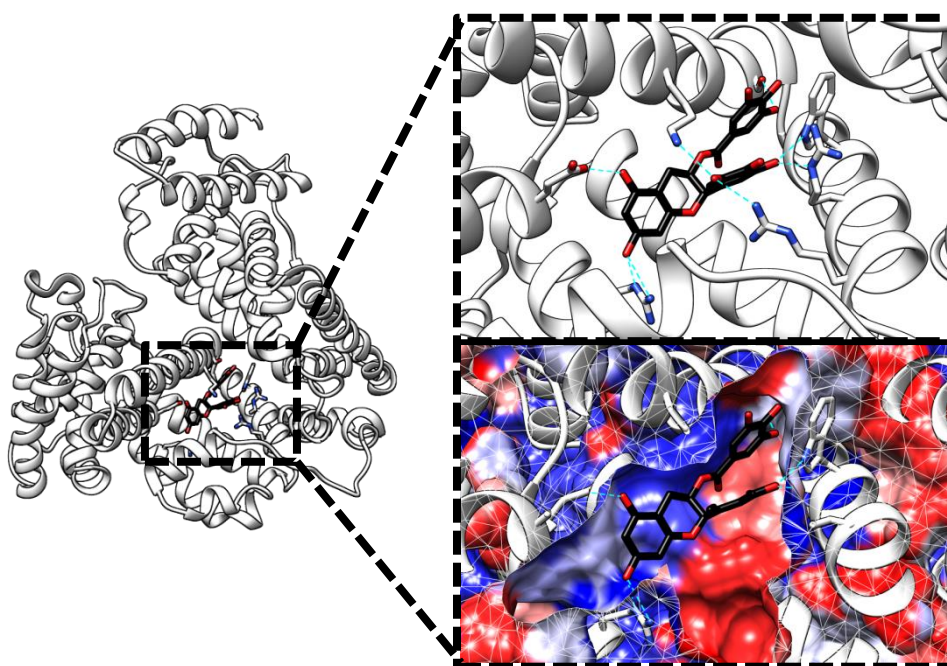


Figure 38. HSA-EGCg の複合体モデル

HSA (白)、EGCg (黒)、水素結合 (---)

Kyte–Doolittle hydrophobicity scale (親水性領域：青、疎水性領域；赤)

※構造は UCSF Chimera⁶⁹ を用いて作成

この研究で使用されたドッキングスコア機能は、いくつかの物理的および経験的な用語から構成されている⁷⁰。ドッキング結果をより詳細に解釈するため、ドッキングスコアを個々のスコア条件に分解した。本研究において、ITC を用いた物理化学原理を基盤とした熱力学測定によって、HSA-カテキン間の相互作用理解に努めてきた。それゆえ、*in silico* のドッキングスコアの解釈においても、静電的寄与 (if_X_fa_elec) とファンデルワールス寄与 (if_X_fa_atr と if_X_fa_rep) の2つの物理ベースの用語に焦点を当てて解析を行った。その結果、ガロイル基を有するカテキンが、静電的相互作用とファンデルワールス相互作用の両方について、ガロイル基を有さないカテキンよりも負の値を有することを見出した

($R = 0.67$, Figure 39)。この結果は、ガロイル基を有するカテキン類が他のカテキン類よりもこれらの相互作用力を利用する傾向があることを示唆している。そこで、ガロイル基が示す物理化学パラメーターをより詳細に検証することとした。

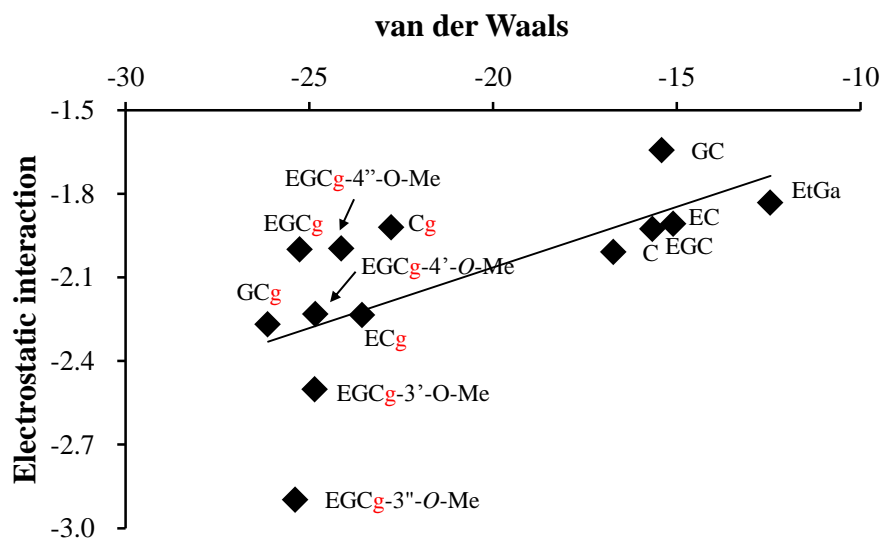


Figure 39. Rosetta を用いた静電相互作用と van der Waals 相互作用の相関図

水素結合は角度によって得られるエネルギーが異なることが知られている⁷¹。前述したように、ガロイル基を有するカテキン類においては形状相補性 (S_c) が高い傾向を示すことから、水素結合も複合体の安定化結合エネルギーへの寄与も大きいと考えられる。そこで、ガロイル基を有するカテキン類と HSA との相互作用における水素結合のエネルギーを検証した。その結果、水素結合とファンデルワールス相互作用に良い相関性を示した ($R=0.88$, Figure 40)。つまり、ガロイル基は、静電相互作用、水素結合、ファンデルワールス力などを効率的に形成することによって親和性を稼ぐこと示唆する結果が得られた。

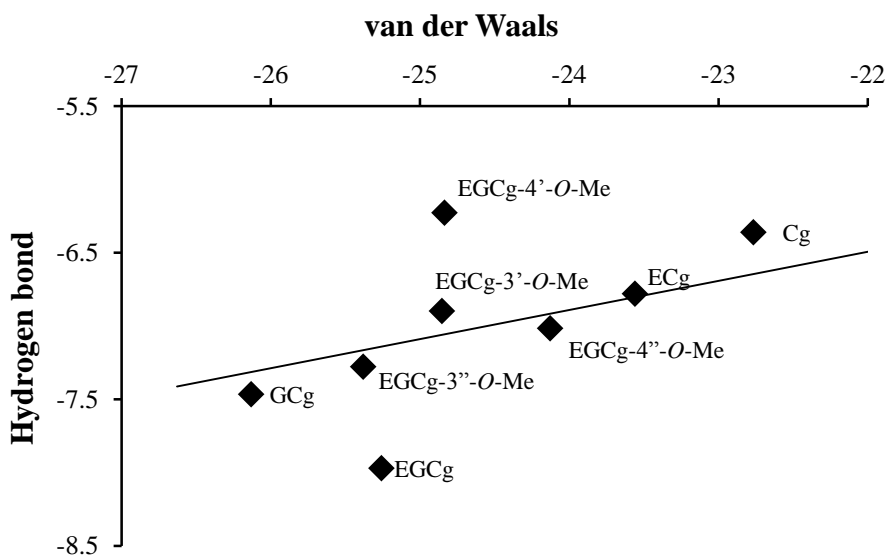


Figure 40. Rosetta を用いた水素結合と van der Waals 相互作用の相関図

さらに、この結果は、NaCl 存在下および非存在下における HSA-カテキン相互作用に関する ITC 測定結果と一致する。また、ITC によって測定された結合親和性は、Rosetta で計算された水素結合エネルギーと高い相関があり (Figure 41、 $R = 0.94$)、水素結合が HSA とカテキン間の相互作用の重要な決定因子であることが示唆された。

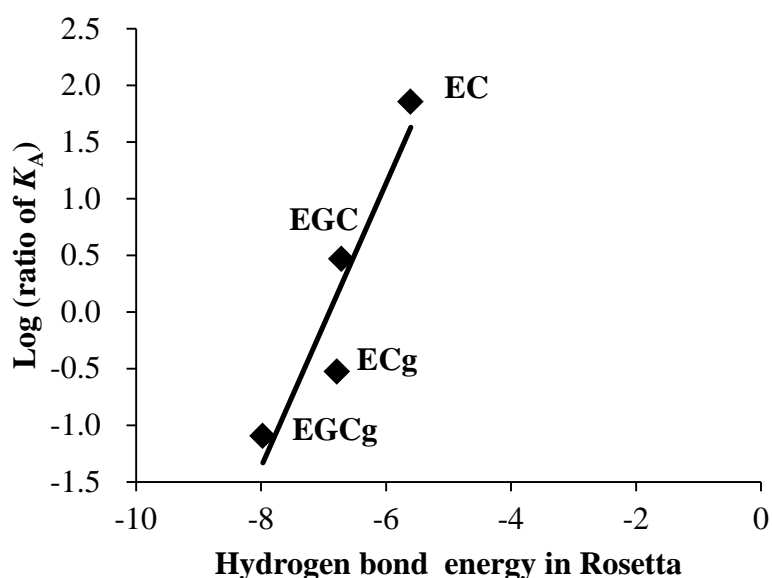


Figure 41. 水素結合に伴うエネルギーと NaCl 添加時の親和性の変化との相関図

2.5 本研究のまとめ

ITC、DSC を用いた熱力学的分析、NMR を用いた分光解析および *in silico* ドッキングシミュレーションは、カテキン構造内のガロイル基が HSA への結合親和性を向上させることを示唆している。このことは、ガロイル基を有するカテキン類は、より大きな BSA、形状相補性、および水素結合性の向上により大きなエンタルピー得を得ることが可能となったことに由来する。本研究では、モデル標的蛋白質として、HSA に着目した。本知見を一般化し、カテキン類の各官能基ごとなどの化学構造、特にガロイル基の役割をさらに探るために、第 3 章以降では HSA 以外の様々な物性を有する蛋白質にも相互作用解析を拡張した。

第3章

異なる物性を有した蛋白質の 茶カテキン結合に関する分子認識特性

第3章 異なる物性を有した蛋白質の茶カテキン結合に関する分子認識特性

3.1 本研究の目的と戦略

第2章において、カテキン類は各々の官能基を用いて HSA への親和性を稼ぐことを明らかにし、特にガロイル基がその大きな役割を担っていることを見出した。そこで第3章では、カテキン類の分子認識における蛋白質の特徴を理解するため、「カテキンが熱力学的に認識しやすい蛋白質が存在する」との仮説を立て、カテキンと様々な蛋白質との相互作用解析を行った。様々な蛋白質とは何を意味するのか、我々は、蛋白質を物性視点および構造視点で分類し、カテキンが示す蛋白質の分子認識について理解を深めることとした

(Figure 42)。カテキンは第2章で特異な特性を示すガロイル基を有する EGCg を用いることとした。

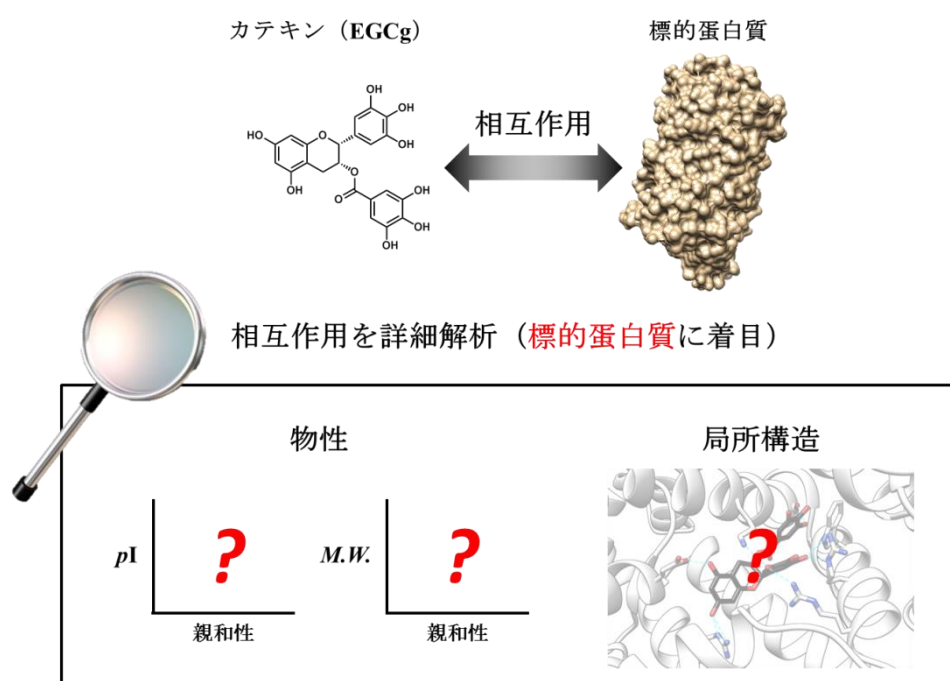


Figure 42. 異なる物性を有した蛋白質の茶カテキン結合に関する分子認識特性の概念図

3.2 標的蛋白質とカテキンとの相互作用解析

3.2.1 標的蛋白質の選択方法

蛋白質を分類する考え方は様々ある。そこで、分類の方法として参考としたのが、蛋白質を分離する手法のクロマトグラフィーである。クロマトグラフィーは、固定相または担体と呼ばれる物質の表面あるいは内部を、移動相と呼ばれる溶媒が通り抜ける過程で、固定相の物質と移動相内の物質(溶質)の間で生じる相互作用を利用し、異なる「性質」の溶質を分離する手法である。蛋白質もこのクロマトグラフィーによって分離、精製されるのが一般的である。ここでいう「性質」とはなんだろうか。クロマトグラフィーには様々

な種類があり、その原理から蛋白質の「性質」を知ることができる。

◆等電点 (isoelectric point: pI)

イオンクロマトグラフィーは、電気的な性質（電荷）で蛋白質を分離する手法である。蛋白質は全体として電荷をもっている。この特徴を利用し、正電荷を示す塩基性蛋白質は負電荷をもつ担体（陽イオン交換体）に、一方、負電荷を示す酸性蛋白質は正電荷を持つ担体（陰イオン交換体）に結合する。これはイオン結合によるもので、試料をイオン交換体を詰めたカラムに結合させた後、溶媒の塩濃度を増加させることで、イオン結合が弱まり、結合力の弱い蛋白質から順に外れて流れ出ていく (Figure 43)。

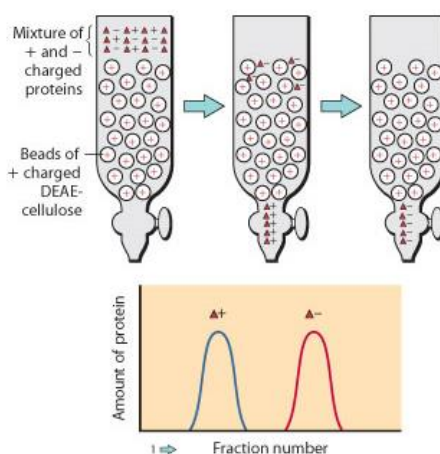


Figure 43. イオンクロマトグラフィーの原理⁷²

このように、蛋白質が電荷によって分離される。蛋白質の電荷は等電点 (isoelectric point: pI) という指標で示される。pIは正負の電荷の総和が0で電気泳動的にプラス側にもマイナス側にも移動しないpHのことである。つまり、蛋白質を分類する物性の1つに**等電点**がある。

◆分子量

ゲルろ過クロマトグラフィーは、分子量の違いによって蛋白質を分離する方法で、分子篩と呼ばれている。試料を小さな孔の開いている担体を詰めた管（カラム）の上部に加えて流すと、分子量の小さい蛋白質はその孔に入り込みながら流れ、大きな蛋白質は孔に入らずにそのまま流れ落ちる。そのため、カラムを通過する時間が小さい蛋白質は遅く、大きい蛋白質は早くなるため蛋白質を大きさで分類することが可能となる (Figure 44)。つまり、蛋白質を分類する物性の1つに**分子量**がある。

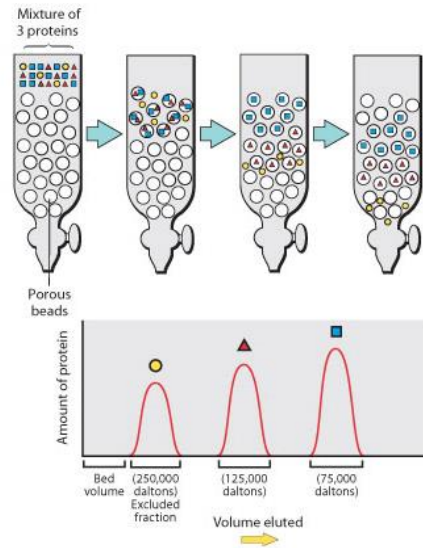


Figure 44. イオンクロマトグラフィーの原理⁷²

◆局所構造

アフィニティークロマトグラフィーは結合親和性で蛋白質を分離する手法である。酵素、受容体、抗体などの蛋白質はリガンドへの強い結合親和性を有する。リガンドを固定化した担持カラムを作製し、そこに蛋白質溶液を添加すると、リガンドと結合する蛋白質のみがカラムに保持される。ここにリガンドまたはリガンド様物質を含む溶液を添加すれば、競合的に目的蛋白質のみを分離することが可能となる (Figure 45)。

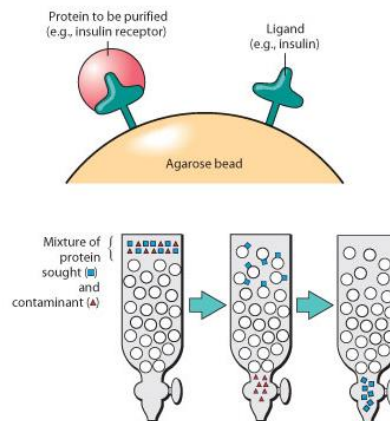


Figure 45. イオンクロマトグラフィーの原理⁷²

この際重要となってくるのが、抗原-抗体間でみられるような抗原認識**特異性**である。IgG抗体を例にとると、IgG抗体は重鎖2本、軽鎖2本のポリペプチドからなる蛋白質である。

重鎖、軽鎖はともに可変領域と定常領域をもつ。可変領域には相補性決定領域 (complementarity determining region : CDR) と呼ばれる領域があり、特定の抗原と結合する (Figure 46)⁷³。つまり、分子全体の構造ではなく、ある部位、局所部位が結合には重要な因子であることを示している。そこで、蛋白質の**局所構造**も前述の蛋白質を分類する手法の一つである。

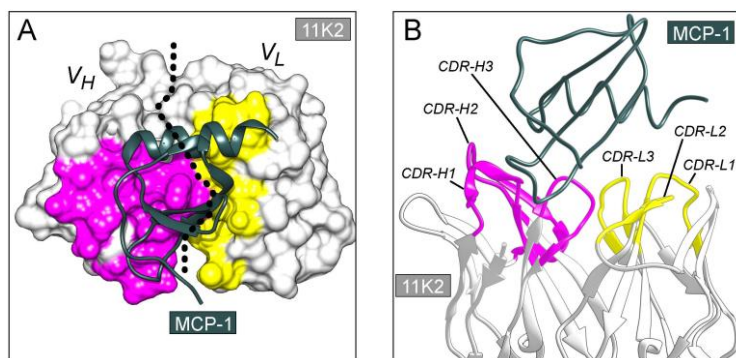


Figure 46. 抗体の CDR 領域に抗原の認識機構⁷³

3.2.2 標的蛋白質との相互作用解析

3.2.2.1 分子量、等電点が異なる蛋白質を標的とした相互作用解析

分子量、等電点を指標とし、様々な蛋白質とカテキンの 1 種である EGCg との相互作用解析を行った。標的蛋白質の分子量および等電点を Table 8 に示す。

Table 8. 標的蛋白質の物性値

Sample	pI	M.W. (KDa)
HSA	4.8	66
Ovalbumin	4.5	45
α -Lactalbumin	4.8	18.3
α -Casein	4.5	23
κ -Casein	5.0	19
Conalbumin	6.1	76
Lactoferrin	8.7	80
Aprotinin	10.5	6.5
Lysozyme	11.4	14.3

【測定条件】

測定機器：VP-ITC(Malvern Instruments Limited.)

セル：50-100 μ M 各蛋白質

シリンジ：500-1000 μ M EGCg

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

上記標的蛋白質と EGCg との相互作用について、ITC を用いた熱力学測定の結果を Figure 47 に示す。EGCg はこれらすべての蛋白質と相互作用することが明らかとなった。また、親和性、熱力学パラメーターは異なることが明らかとなった。さらに、分子量、pI それぞれに対して親和性との相関性を検証したところ、相関性は見られなかった (Figure 48)。

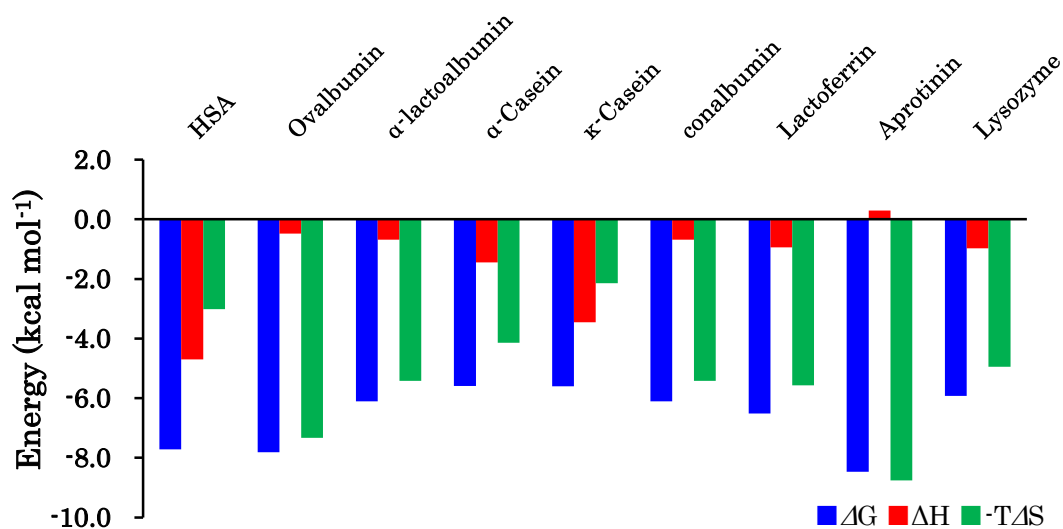


Figure 47. EGCg と標的蛋白質との相互作用時の熱力学パラメーター

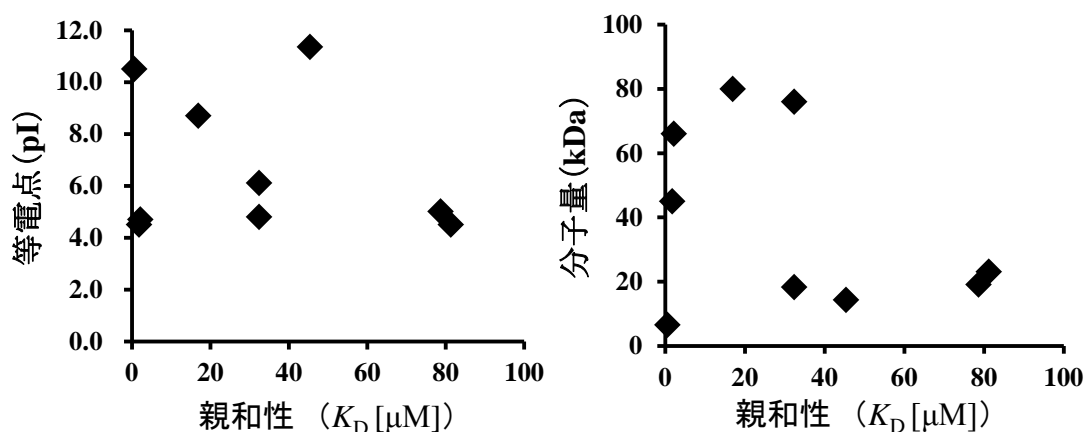


Figure 48. 分子量および等電点と親和性との相関図

3.2.2.2 局所構造の異なる蛋白質による EGCg への分子認識の相違

抗体-抗原間の相互作用様式からわかるように、分子認識に対する局所構造の重要性は明

らかである。そこで、全体構造が類似する蛋白質間において EGCg への相互作用にどのような変化が生じるかを検証した。そこで、標的とした蛋白質が、ヒト血清アルブミンおよびウシ血清アルブミンである。両者の配列相同性は 76% と高く、立体構造も類似することが知られている (Figure 49) ⁷³。

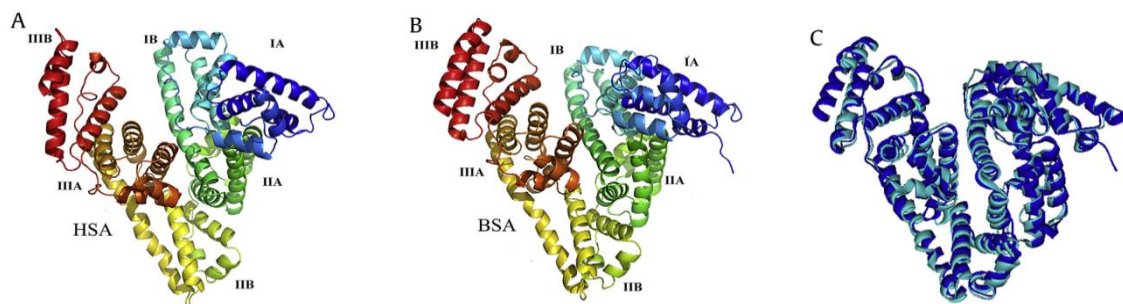


Figure 49. HSA と BSA の構造および重ね合わせの立体構造 ⁷⁴

その一方で、HSA および BSA のサブユニット II A に存在する薬物結合ポケットである site I において、HSA では 195 番目、199 番目のアミノ酸が Lysine であるのに対して、BSA では同一位置に存在する 194 番目、198 番目のアミノ酸が Arginine と相違があることが知られている (Figure 50) ⁷⁵。そこで、site I はカテキンが結合する部位であることから、EGCg の結合特性に違いが出ると考え、相互作用の解析を行った。

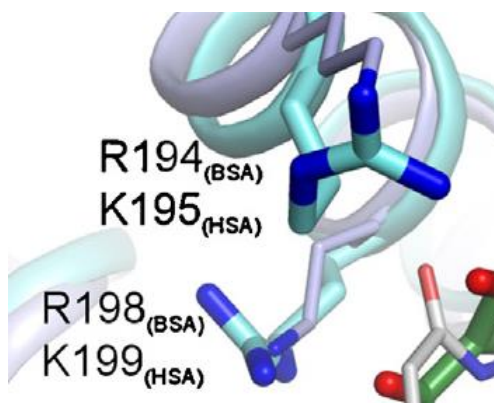


Figure 50. HSA と BSA の site I を形成するアミノ酸の相違 ⁷⁵

【測定条件】

測定機器：VP-ITC(Malvern Instruments Limited.)

セル：50 μ M BSA

シリンジ：500 μ M EGCg

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

ITCを用いてBSAとEGCgとの相互作用解析を行った。その結果、HSAに対して、BSAの方がエンタルピー得により親和性を稼いでいることが明らかとなった (Figure 51)。

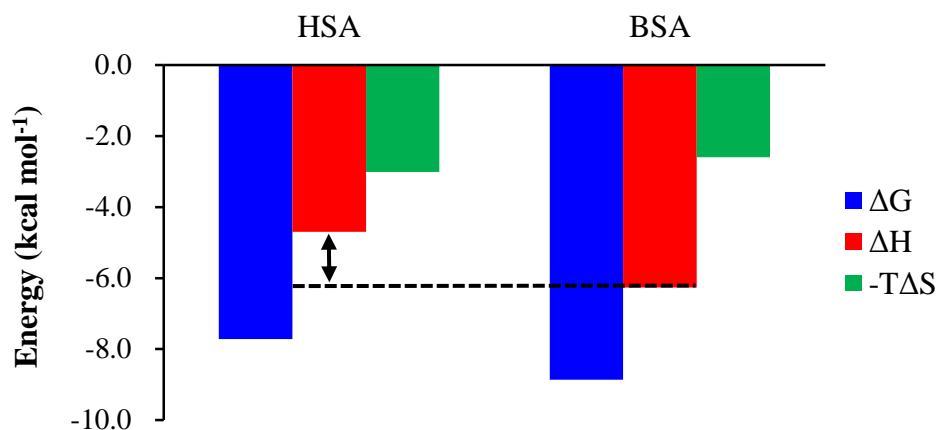


Figure 51. HSA およびBSA とEGCg のITC 測定結果

ドッキングシミュレーションにおいて、195番のLysineはEGCgと相互作用（水素結合）していることが確認されている (Figure 52)。その一方で、199番のLysineは相互作用していない。BSAにおいて、LysineがArginineに変異していることから、Arginineと水素結合することが予想される。

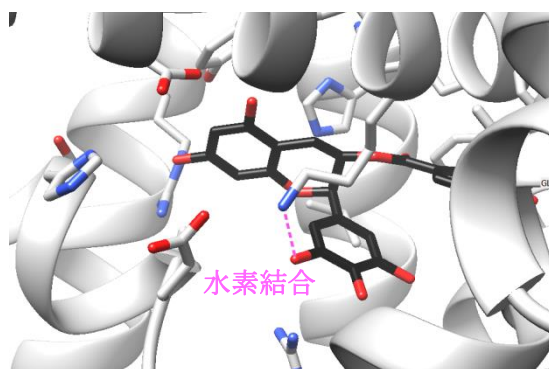


Figure 52. HSA のK195 とEGCg との水素結合形成

平野らは、分子動力学計算を用いてアルギニン1分子とEGCgのガロイル基を模倣したアルキルガレート1分子の間の結合の自由エネルギーを計算したところ、最安定状態ではアルギニンのグアニジニウム基がアルキルガレートの芳香環と相互作用することを明らかにしている (Figure 53)⁷⁶。さらに、MasonらはX線小角散乱、分子動力学計算を用いて、アルギニンが有するグアニジン平面の直上と直下は脱水和していることを提案している。

すなわち、グアニジンの表面は疎水性を有しているといえる。その一方で、平面の縁に相当する領域は十分に水和し、親水性を示していると考えられる^{77,78}。つまり、アルギニンのグアニジウム基の表面の疎水性領域がアルキルガレーとの芳香環と疎水性相互作用していると予想される。さらに、グアニジウム基は正に荷電しているため、カチオン- π 相互作用も働いていると考えられる。

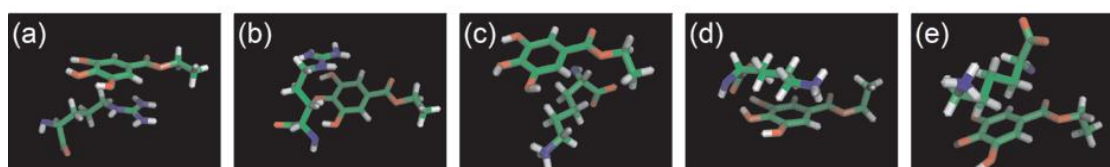


Figure 53. アルキルガレーとアルギニンの最安定構造の代表例⁷⁶

これらのことから、HSA よりもエンタルピーを稼ぐことが可能となったのではないかと考察できる。すなわち、1アミノ酸変異という局所構造の違いがEGCgとの相互作用においては重要であることが明らかとなった。

3.3 データベースを用いた標的蛋白質とカテキンとの相互作用解析

3.3.1 標的蛋白質の検索方法

化合物データベースは世の中にいくつかある。その1つにPubchemというデータベースがある⁷⁹。Pubchemは化合物のライブラリーデータベースの一つである。このシステムは、アメリカ国立衛生研究所(NIH)の下で国立医学図書館(NLM)の一部門である国立生物工学情報センター(NCBI)によって維持、管理されている。本データベースは無償公開である。2015年現在で60,810,195個の化合物が登録されており、何らかのバイオアッセイ(in vitro, in vivo)で活性を示すものだけに限っても1,000,088個のデータセットを有している⁷⁹。つまり、検索化合物が示す生理活性の結果およびその標的蛋白質を知ることができる。標的蛋白質を知ることが出来れば、その蛋白質が示す機能を知ることが出来る。ここで言う機能とは、分子性機能つまり、蛋白質単体が持つ生化学的な機能のことである。例えば、ダイニンという蛋白質は、ATP分解酵素としての分子性能がある。すなわち、EGCgが相互作用しやすい蛋白質には機能としてどんな特徴があるのかを知ることができる。

データの出力の方法は、Pubchemのbioassayの項目にて、検索ワードとし、”Epigallocatechin gallate”と入力することで、EGCgが活性を示す標的蛋白質を入手した。評価項目としては、50%阻害濃度であるIC₅₀、阻害剤の親和性であるK_i、結合解離定数K_D、薬剤の効果を出すために必要な薬剤の投与濃度であるPotencyによって評価されている。

3.3.2 標的蛋白質の取得

上記手順で検索を行うと63種の標的蛋白質がヒットした。蛋白質名とその機能分類をTable 9に示す。また、それらを機能視点で比率として表すと、大部分が酵素であることが

分かった (Figure 54)。

Table 9. EGCg の標的蛋白質

	Proteins	Molecular function
1	Matrix metalloproteinase-14	Hydrolase, Metalloprotease, Protease
2	72 kDa type IV collagenase (matrix metalloproteinase-2 (MMP-2))	Hydrolase, Metalloprotease, Protease
3	human Serum albumin	Transfer protein
4	Chain A, Structure Of Human Recq-Like Helicase In Complex With A DNA Substrate	Exonuclease, Helicase, Hydrolase, Nuclease
5	Chain A, Crystal Structure Of The Human 2-Oxoglutarate Oxygenase Loc390245	Oxygen oxidoreductase
6	Microtubule-associated protein tau [Homo sapiens]	Developmental protein
7	phosphopantetheinyl transferase [Bacillus subtilis]	Transferase
8	Chain A, Human Ape1 Endonuclease With Bound Abasic Dna And Mn ²⁺ Ion	Activator, Endonuclease, Exonuclease, Hydrolase, Lyase, Nuclease, Repressor
9	Galactokinase [Homo sapiens]	Kinase, Transferase
10	Matrilysin (MMP-7)	Hydrolase, Metalloprotease, Protease
11	Chain A, Influenza Strain Ph1n1 2009 Polymerase Subunit Pa Endonuclease	Endonuclease
12	Thyroid hormone receptor beta isoform 2 [Rattus norvegicus]	Receptor
13	Chain A, Structural And Functional Insights Of Directly Targeting Pin1 By Epigallocatechin-3-Gallate	Isomerase, Rotamase
14	Microtubule-associated protein tau	Developmental protein
15	Beta-secretase 1 (Eu-CEVNLDAEFK-Qsy7 peptide)	Aspartyl protease, Hydrolase, Protease
16	Hepatocyte growth factor receptor	Kinase, Receptor, Transferase, Tyrosine-protein kinase
17	Chain A, The Solution Structure Of Human Cardiac Troponin C In Complex With The Green Tea Polyphenol	Muscle protein
18	Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 [Homo sapiens]	Chromatin regulator, Methyltransferase, Transferase
19	intestinal alkaline phosphatase precursor [Mus musculus]	Hydrolase
20	AR protein [Homo sapiens]	Activator, Receptor
21	Chain B, The Structure Of Wild-Type Human Hadh2 (17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 10)	Oxidoreductase

22	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) [Homo sapiens]	Transcription, Transcription regulation
23	Valosin-containing protein [Homo sapiens], ER ATPase (Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase), CDC48	Hydrolase
24	regulator of G-protein signaling 4 [Homo sapiens]	Receptor
25	Reverse transcriptase/RNaseH	Nucleotidyltransferase
26	3-oxoacyl-acyl-carrier protein reductase precursor	Oxidoreductase
27	3-oxoacyl-(Acyl-carrier protein) reductase, putative	Oxidoreductase
28	Beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase precursor (Fatty acid synthesis protein)(Fabz)	Lyase
29	Enoyl-acyl-carrier protein reductase precursor (FabI)	Oxidoreductase
30	RGS8 protein [Homo sapiens]	GTPase activation, Signal transduction inhibitor
31	vitamin D3 receptor isoform VDRA [Homo sapiens], VDR	Receptor
32	Zinc finger protein mex-5	Developmental protein
33	polyadenylate-binding protein 1 [Homo sapiens]	translation activator activity
34	Eukaryotic translation initiation factor 4H [Homo sapiens], EIF4	Initiation factor
35	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit isoform 1 [Homo sapiens], NFkB-p105	Activator
36	GNAO1 protein [Homo sapiens] Gα	Transducer
37	15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase [NAD(+)] isoform 1 [Homo sapiens]	Oxidoreductase
38	M18 aspartyl aminopeptidase [Plasmodium falciparum 3D7]	Aminopeptidase
39	Dihydrolipoamide dehydrogenase [Homo sapiens]	Oxidoreductase
40	MPI protein [Homo sapiens]	Isomerase
41	Thioredoxin glutathione reductase [Schistosoma mansoni]	Oxidoreductase
42	Cytochrome P450 3A4 isoform 1 [Homo sapiens], CYP3A4	Monoxygenase, Oxidoreductase
43	Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha isoform a [Homo sapiens], Gα	Transducer
44	Acetyl-CoA acetyltransferase/HMG-CoA reductase [Enterococcus faecalis]	Transferase
45	DNA polymerase kappa [Homo sapiens]	DNA-directed DNA polymerase, Mutator protein, Nucleotidyltransferase, Transferase

46	Mcl-1 [Homo sapiens] ,Induced myeloid leukemia cell differentiation protein,	Developmental protein
47	Potassium voltage-gated channel subfamily H member 2	Ion channel, Potassium channel, Voltage-gated channel
48	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 2B [Homo sapiens] BAZ2B	Zinc Finger
49	Telomerase reverse transcriptase	Nucleotidyltransferase, Ribonucleoprotein, RNA-directed DNA polymerase, Transferase
50	DNA polymerase beta [Homo sapiens]	DNA-directed DNA polymerase, Lyase, Nucleotidyltransferase, Transferase
51	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A	Kinase, Serine/threonine-protein kinase, Transferase, Tyrosine-protein kinase
52	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 ,Pin1	Isomerase, Rotamase
53	Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta ,STAT1	Activator
54	Squalene monooxygenase	Oxidoreductase
55	RGS7, partial [Homo sapiens]	GTPase activation, Signal transduction inhibitor
56	gene 4 small orf - Marburg virus [Marburg marburgvirus] type I	Envelope glycoprotein
57	CPG DNA methylase	Methyltransferase, Transferase
58	Apoptosis regulator Bcl-2	Developmental protein
59	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Oxidoreductase
60	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	Activator, Kinase, Receptor, Transferase, Tyrosine-protein kinase
61	Neutrophil elastase	Hydrolase, Protease, Serine protease
62	Dihydrofolate reductase	Oxidoreductase
63	Amyloid beta A4 protein	Protease inhibitor, Serine protease inhibitor

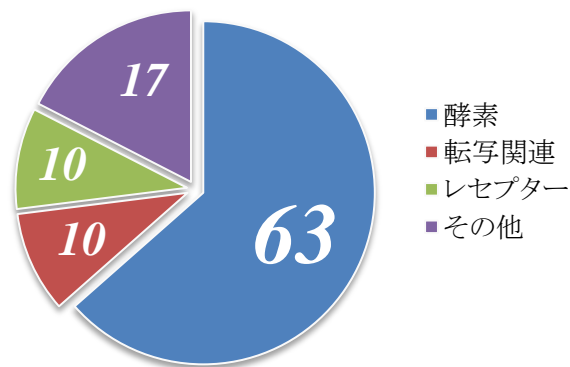


Figure 54. 標的蛋白質の機能分類

さらに我々は、これまでの研究から、局所構造が EGCg の分子認識に影響を与える知見を得ている。そのため、局所構造情報に焦点を当て、蛋白質を分類することとした。そこで、各蛋白質それぞれのリガンドを調査したところ、驚くべきことに標的蛋白質の 73% は DNA、ATP、GDP などのヌクレオチドを基質とし、11% がカルシウムイオン、鉄イオンなどの金属イオンを基質とする蛋白質であった (Figure. 55)。一般的に核酸結合蛋白質は共通の構造を持っていることが知られている。つまり特定の構造に EGCg と相互作用しやすいことがうかがえる。そこで、Pubchem にて標的蛋白質として明らかにされていない ATP 結合蛋白質においても EGCg と相互作用するか否かの検証を行った。

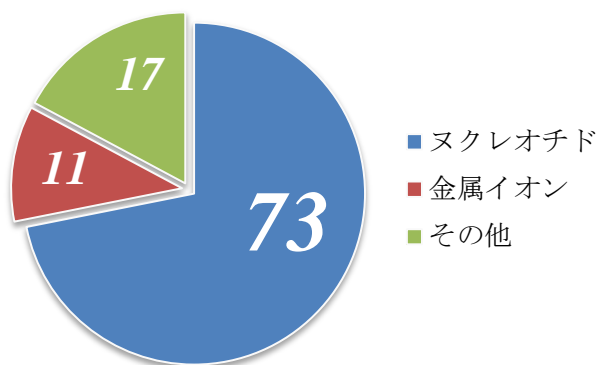


Figure 55. 標的蛋白質の基質

3.3.3 ERK2 と EGCg の相互作用解析

Extracellular signal-regulated kinase2 (ERK2) は、ATP などの高エネルギーリン酸結合を有する分子からリン酸基を基質あるいはターゲット分子に転移する (リン酸化する) 酵素である。ATP 結合蛋白質であるキナーゼの一種であり、細胞外からの刺激を、核に伝達する MAP キナーゼ・サブファミリーの一つである (Figure 56)⁸⁰。細胞外受容体である受容体型チロシンキナーゼ (チロシンキナーゼ受容体) (RTK) にリガンドが結合することで、Grb2

および SOS が受容体に結合し、SOS が Ras にリン酸基を転移させ活性化する。活性化した Ras は GTP と結合し、Raf を活性化させ、さらに MEK を活性化させる。続いて、ERK を活性化させる。活性化した ERK は 2 量体を形成し、核内に移行する。その後、細胞増殖転写因子であるセリン・スレオニン残基をリン酸化し、細胞増殖を促進する。つまり、ERK2 は、細胞分裂において重要な役割を担うことから、ERK2 の異常は癌やアルツハイマー病などの様々な疾患に対するマーカーとして報告されている。

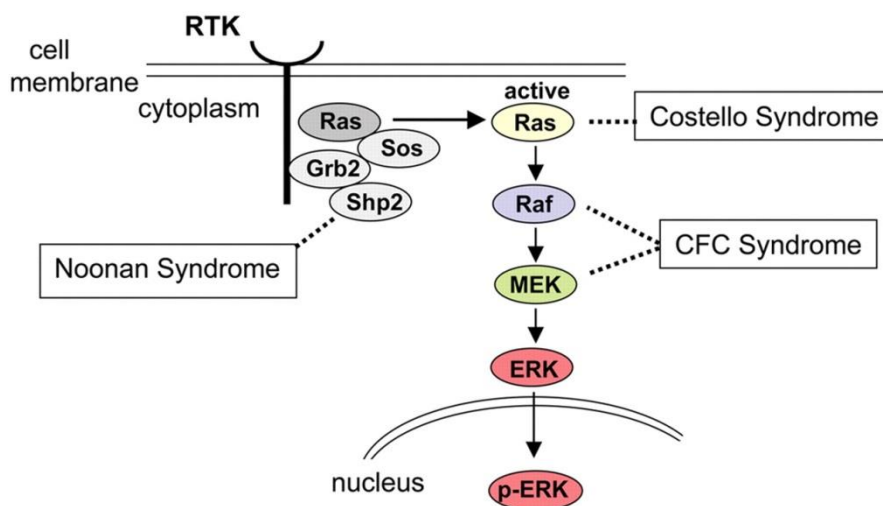


Figure 56. ERK2 の役割⁸⁰

ERK2 は Figure 57 に示すように、 α ヘリックスリッチな構造で、ATP 結合サイトを持つことが知られている⁸¹。また、ERK2 のような ATP に結合するキナーゼ間で ATP 結合サイトは保存されていることが知られており、様々な化合物が同一位置に結合することが知られている⁸²⁻⁸⁴。前述の調査の結果から、ATP 結合蛋白質に EGCg が相互作用する可能性が示唆される。その一方で、EGCg および他のカテキン類と ERK2 が相互作用することは知られていない。ATP 結合蛋白質に EGCg が相互作用するという仮説が正しければ、ATP 結合蛋白質である ERK2 と EGCg は相互作用するはずである。そこで、ERK2 とカテキン類との相互作用の有無を ITC を用いて検証を行った。

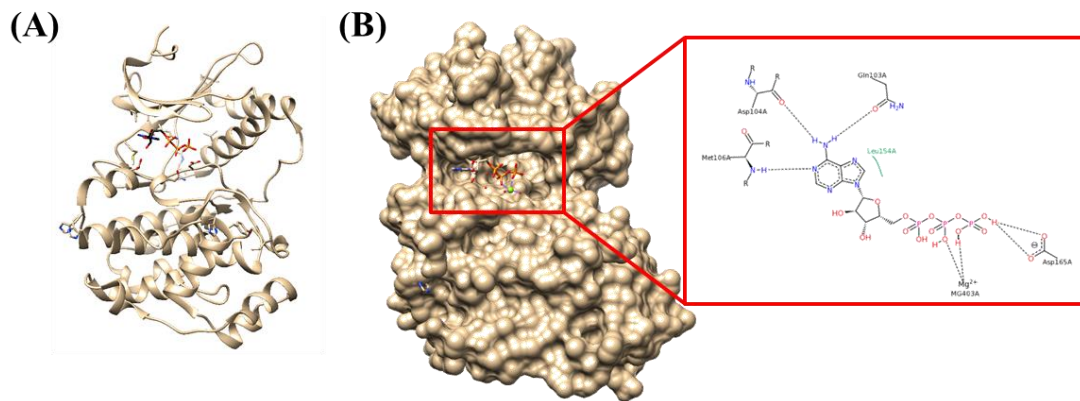


Figure 57. ERK2 の立体構造 (PDB ID: 4GT3)
 (A) ERK2 の立体構造、(B) ERK2 と ATP の相互作用様式

3.3.3.1 発現・精製

◆トランスフォーメーション

- ①コンピテントセル(BL21)を on ice で半解凍させる
- ②半解凍後 ERK2 DNA を $1\mu\text{L}$ 加える
- ③on ice で 30 分静置する
- ④ 42°C 、5 分静置する
- ⑤3 分、on ice で静置する
- ⑥ $750\mu\text{L}$ の LB 培地を加え、1 時間、 37°C 、攪拌する
- ⑦ 3000G 、3 分、遠心分離し、上清を傾けて捨て、沈殿物を残す
- ⑧ピペットマンで懸濁させ、カナマイシン (Km) 耐性寒天培地(プレート)にまく
- ⑨ 37°C で一晩静置させる

◆プレカルチャー

- ①試験管培地(LB 培地 3ml)に Km 水溶液 5mg/ml を $30\mu\text{L}$ 入れる (試験管 8 本作成)
- ②プレートに形成されたコロニーを 3 ヶ所ずつ 1 本の爪楊枝でつつき、①の試験管に入れる
- ③蓋をし、 37°C 、160rpm で一晩振盪させる

◆培養

- ①オートクレーブした 1L LB 培地 (バッフル) に Km 50 mg/ml を 1ml 入れる
- ②プレカルチャーした 3 ml 培地を 4 本まとめる
- ③2 mL ずつ 4 つの 1L LB 培地 (バッフル) に入れ、残りを均等に加える。
この操作を 8 本分行う。

- ④振盪器で 28℃、115 rpm の条件下で振盪させた
- ⑤濁度計にて OD 値 0.6 程度になるまで振盪させる
- ⑥IPTG を加える (1ml/バッフル)
- ⑦振盪器で 20℃、85 rpm の条件下で一晩振盪させる

◆集菌

- ①500ml 遠沈管に培養液 370g 程度を加え、バランスを調整する (計りで±0.5g)
- ②7000g、10min.、4℃で遠心分離を行う
- ③8L 培養液すべてを均等な沈殿物量になるように集菌する
- ④ヘラで 50ml ファルコンチューブに入れる(4本)
- ⑤液体窒素で凍結させ、-30℃で保存する。(His-Tag 精製する場合は、凍結させる必要なし)

◆菌体破碎、His-Tag 精製

- ①凍結保存していた菌体 2L 分に Binding buffer 40ml を加え、融解させる
- ②氷水中にて、超音波破碎を 15 分間行う。
- ③遠沈管に移し、40,000G、30min.、4℃条件下で遠心分離を行う
- ④上澄みを 0.8 μ m フィルターでろ過し、50ml ファルコンチューブに回収する
- ⑤Ni-NTA agarose 溶液 6ml を充填し、金属アフィニティーカラムを作成する
- ⑥Binding buffer(5mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 8.0) 7.5ml を流し、カラムを平衡化させる
- ⑦Ni-NTA カラムにアダプターを装着する
- ⑧フィルター後④破碎液をアプライする
- ⑨wash (20 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)、30ml ずつアプライする
- ⑩wash (50 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)、9ml ずつアプライする
- ⑪Elute (200 mM imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0)、9ml ずつアプライする
- ⑫200ml imidazole 画分を一晩透析する
- ⑬SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにて ERK2 の発現を確認 (Figure 56)

◆サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による精製

カラム : 26/60 superdex75#1

システム:AKTA explorer

流速:2ml/min.

サンプル量:8ml×2 回

buffer: 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 200 mM Arg-HCl-NaOH, pH7.5

※ERK2 の確認は SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングにて行った (Figure 58)。

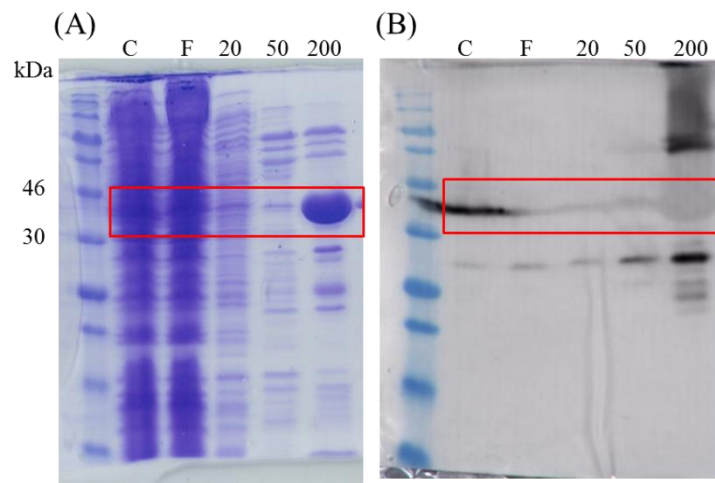


Figure 58. ERK2 の発現および精製確認

(A) His-Tag 精製および SEC 精製の SDS-PAGE、(B) ウェスタンブロッティングの結果
 (C: Culture, F: Flow through, 20: 20mM imidazole, 50: 50mM imidazole, 200: 200mM imidazole)

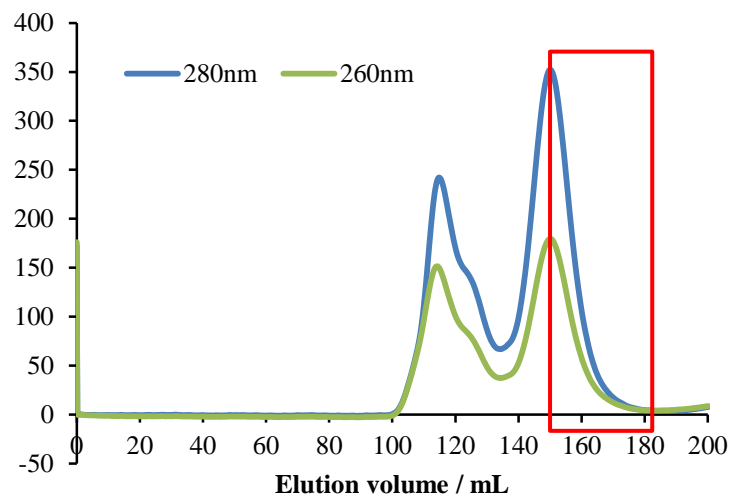


Figure 59. SEC 精製の分析結果

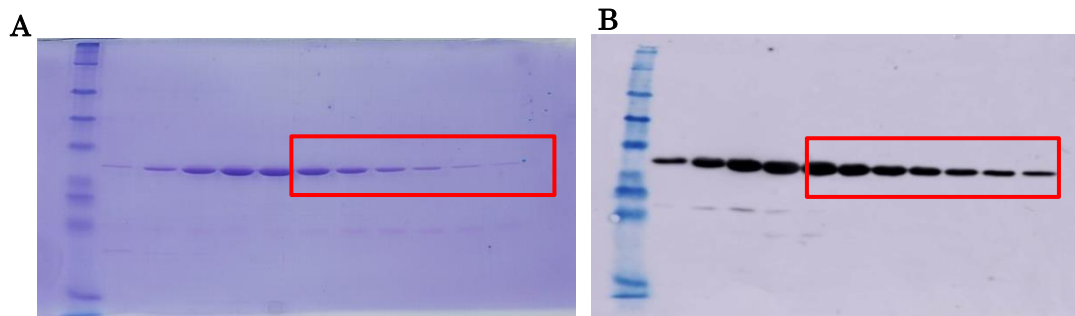


Figure 60. SEC 精製後 SDS-PAGE、ウェスタンブロッティングの結果

3.3.3.2 ERK2 との相互作用解析

3.3.3.2.1 ITC 測定

【測定条件】

測定機器：VP-ITC(Malvern Instruments Limited.)

セル：15 μ ERK2

シリンジ：150 μ M EGCg

Buffer：25mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH7.5

測定温度：25°C

【測定結果】

ITCを用いたEGCgとERK2との相互作用解析の結果、特異的な相互作用かつ高親和性($K_D = 44$ nM)であることが明らかとなった (Figure 61)。熱力学的パラメーターとしては、エンタルピー損、エントロピー得であるエントロピー駆動型の相互作用であった。このことから、EGCgと相互作用することで、ERK2の構造変化または脱水和が生じたことが考えられる。実際にITC測定後、セル内の溶液を取り出し、目視にて確認したところ凝集物がみられた。凝集は蛋白質の天然状態の時に埋もれていたアミノ酸側鎖が変性にともなって露出し、水和することに起因する。つまり、エンタルピー駆動型の反応である。したがってITCによって得られた熱力学パラメーターは凝集に伴う結果であるといえる。

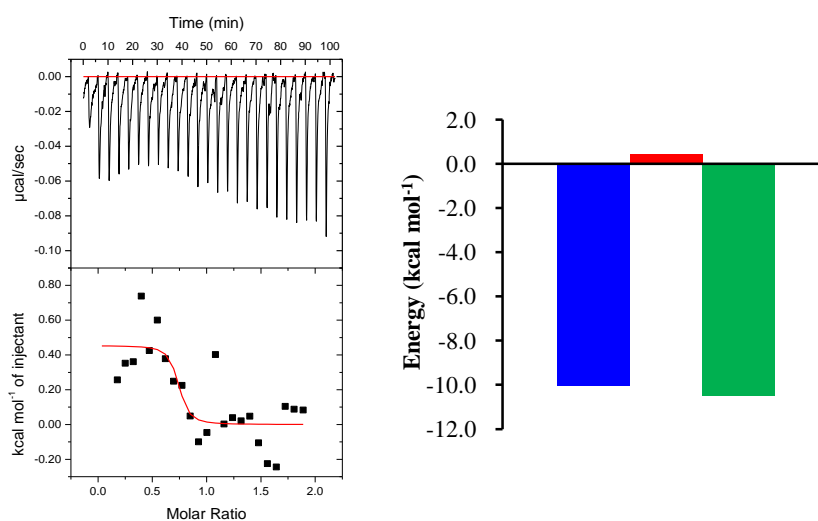


Figure 61. ITC の測定結果

3.3.3.2.2 DSF 測定

EGCg との相互作用により、ERK2 の変性が考えられることから、示差走査型蛍光測定 (Differential Scanning Fluorometry; DSF) を用いて、ERK2 の熱安定性の検証を行った。DSF は蛋白質が温度の上昇とともに構造が変化 (変性) し、疎水性領域の露出とともに蛍光色素の結合が増え、その際の蛍光強度を解析することで変性温度 T_m を測定する手法であり、

蛋白質の熱安定性の指標として用いられる解析法である^{85,86}。そこで、DSFを用いた ERK2 および EGCg を添加した際の ERK2 の熱安定性の検証を行った。

【測定条件】

測定機器：CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System(BIO RAD, USA)

測定試料：4 μ M ERK2、4 μ M ERK2 + 40 μ M EGCg

Buffer：25mM HEPES-HCl-NaOH, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1/100×SYPRO ORANGE、

測定温度範囲：10℃-95℃、昇温速度 0.2℃/秒

【測定結果】

DSF 測定の結果を Figure 62 に示す。左図は温度変化に対する蛍光強度を示し、右図は微小温度変化あたりの微小蛍光強度変化を示す。EGCg 添加時において、蛍光強度の極大値および微小変化の最大値が ERK2 のみの際よりも低温領域に現れたことから、ERK2 の変性温度を下げ、熱安定性を低下させたと言える。この結果は以前の ITC 測定の結果と整合性の取れる結果である。

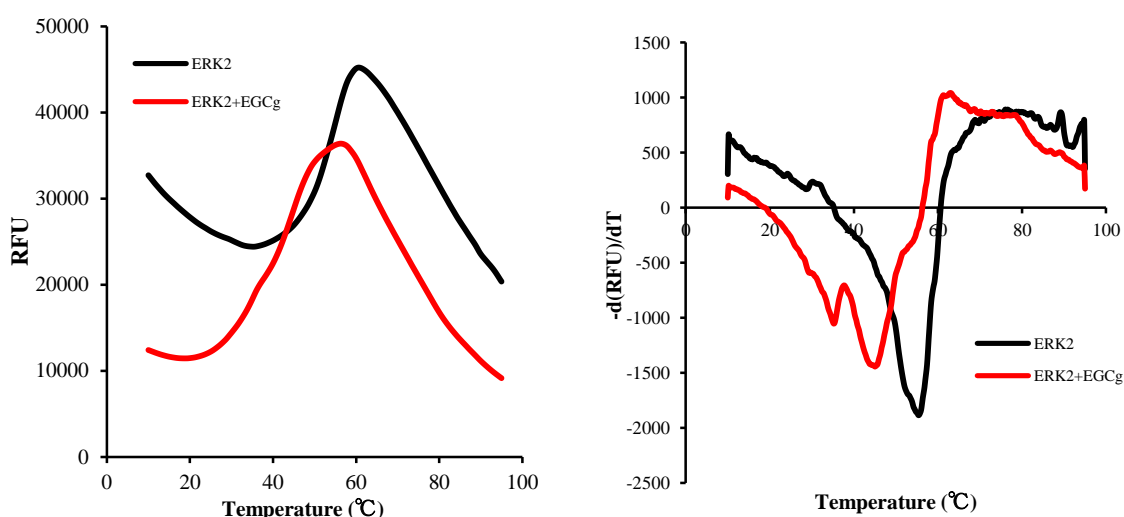


Figure 62. ERK2 および ERK2+EGCg の熱安定性測定

3.3.3.2.3 ERK2 の阻害剤 FR180204 を用いた Competitive assay

これまでの研究から、EGCg は ATP 結合蛋白質である ERK2 に相互作用し、ERK2 の熱安定性を低下させることで凝集させることが明らかとなった。そこで ERK2 の ATP 結合部位に相互作用することが知られている FR180204 と EGCg との Competitive assay を行うことで、EGCg が ATP 結合部位と相互作用するか否かの検証を行った。FR180204 は ERK2 への阻害効果を示すことが既に知られている(Figure 63)⁸⁷。すでに結晶構造も取得されており、Figure 57 に示すように内因性の阻害剤である ATP と同様の結合サイト、同一のアミノ酸が結合に使用されている。以下に測定結果について示す。

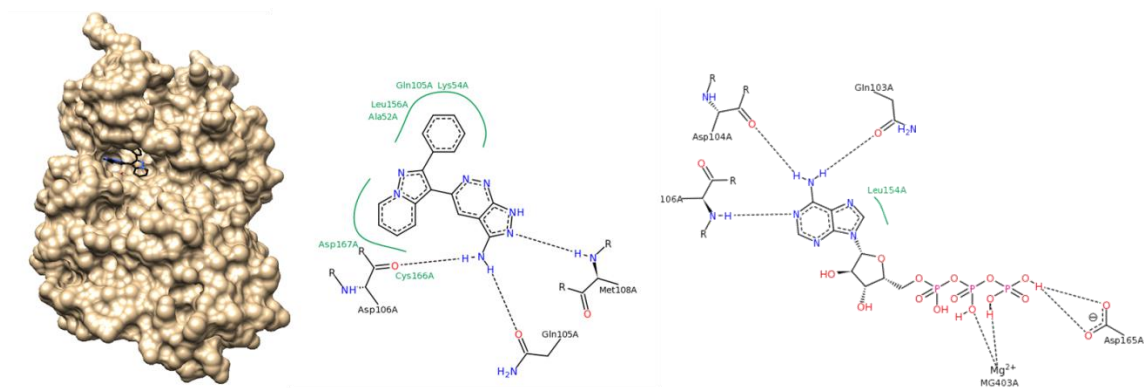


Figure 63. ERK2-ATP および ERK2-FR180204 の共結晶構造と結合アミノ酸のマッピング

【測定条件】

測定機器：VP-ITC(Malvern Instruments Limited.)

セル：15 μ ERK2 or 15 μ M ERK2 – 15 μ M FR180204

シリンジ：150 μ M EGCg

Buffer：25mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH7.5

測定温度：25°C

【測定結果】

FR180204 と複合体を組ませた ERK2 と EGCg との相互作用において、大きな熱力学パラメーターが異なることが明らかとなり、大きな親和性の低下が生じた (Figure 64)。つまり、FR180204 が ATP 結合部位に結合するため、EGCg が相互作用できなくなったことを示唆する結果である。すなわち、EGCg は ERK2 の ATP 結合部位に相互作用していると考察できる。

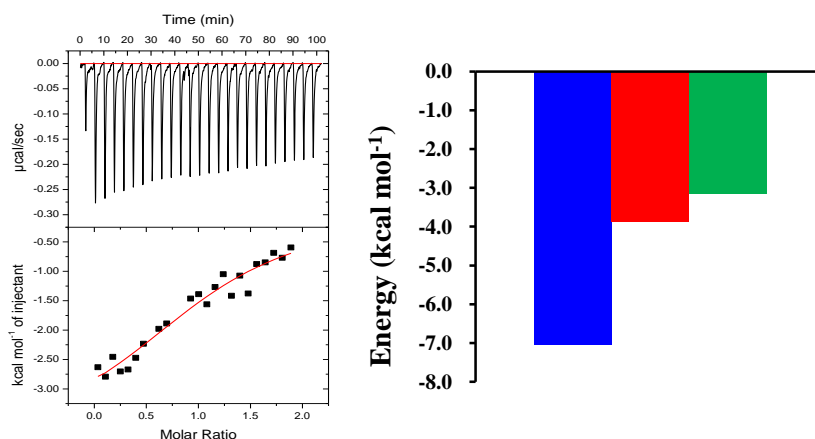


Figure 64. ERK2-FR180204 と EGCg との相互作用解析

EGCgの化学構造を構成する官能基の類似体である Catechol は、ERK2 に結合することがすでに知られており、その結晶構造も取得されている⁸⁸。ERK2 の基質である ATP および FR180204 同様のアミノ酸との結合を介して、同一の結合ポケットに結合することが知られている。ERK2-Catechol 複合体 (PDB ID: 4ZXT) と ERK2-ATP 複合体 (PDB ID: 4GT3) を立体構造の可視化ソフトである UCSF Chimera を用いて重ね合わせたところ、Catechol と ATP の塩基部位である Adenine が同一部位に位置することが明らかとなった (Figure 65)。このことから、EGCg も同一の ATP 結合ポケットへの結合が考えられる。

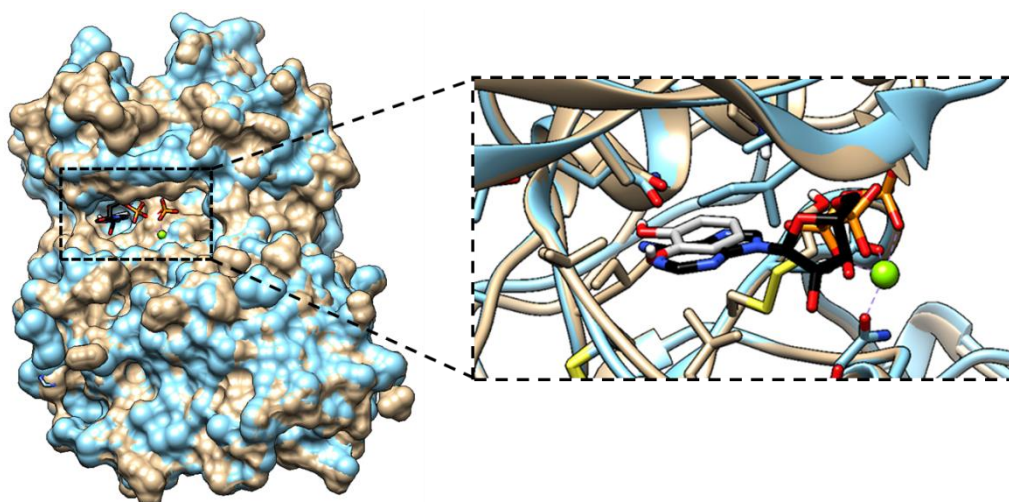


Figure 65. ERK2-Catechol 複合体と ERK2-ATP 複合体の重ね合わせ画像

蛋白質：水色【ERK2-ATP (PDB ID: 4GT3)】、金色【ERK2-Catechol (PDB ID: 4ZXT)】

Ligand：黒: ATP、白: Catechol

3.4 本研究のまとめ

「カテキンが熱力学的に認識しやすい蛋白質が存在する」との仮説を立て、カテキン類の他分子認識における認識相手の特徴を理解するため、カテキン (EGCg) と様々な蛋白質との相互作用解析を行った。その結果、EGCg は様々な蛋白質を認識する一方で、親和性の大きさという観点では、蛋白質固有の分子量や等電点に相関性がないことが明らかとなった。その一方で、蛋白質の局所構造において、EGCg と相互作用しやすい構造があることが明らかとなった (Figure 66)。さらに化合物データベースである Pubchem を用いて、EGCg が何らかの生理活性を示す標的蛋白質を調査したところ、ヌクレオチド結合蛋白質が多く、その1つである ERK2 に対して、EGCg は高親和性かつ特異的に結合することが明らかとなった。すなわち、カテキン特に EGCg は他分子を認識する際に明らかに認識しやすい蛋白質が存在することを示唆する結果が得られた。

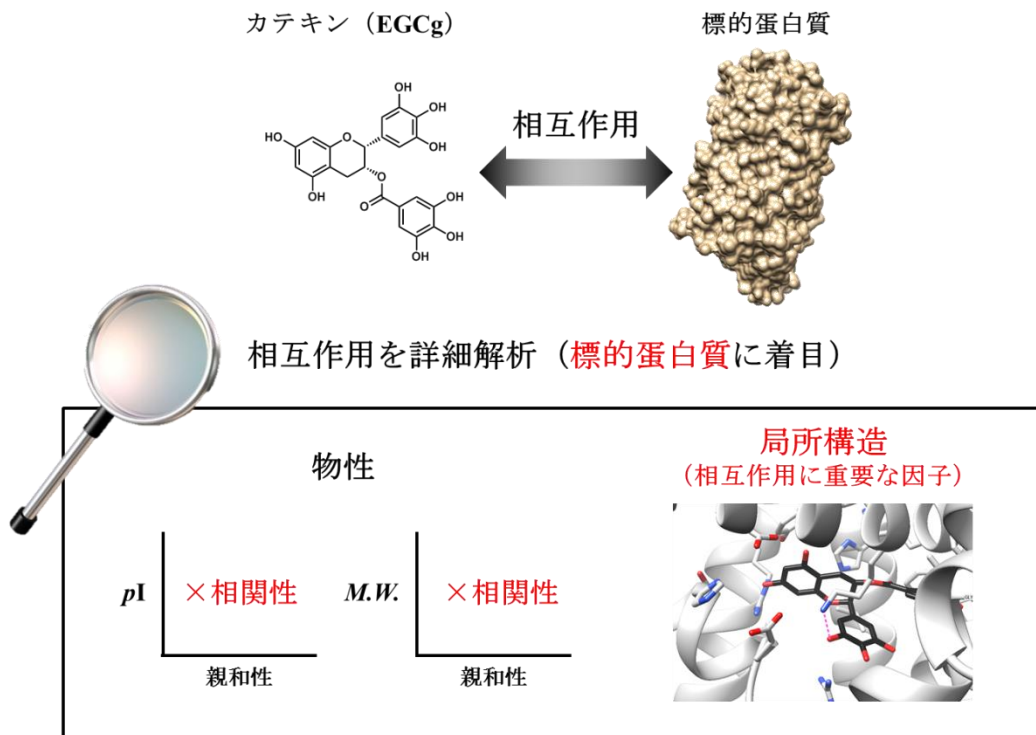


Figure 66. 茶カテキンの他分子認識における標的蛋白質の重要な因子

第4章

蛋白質に対する茶カテキンの官能基レベルにおける分子認識特性

第4章 蛋白質に対する茶カテキンの官能基レベルにおける分子認識特性

4.1 本研究の目的と戦略

第3章では、EGCgが熱力学的に他分子を認識する際には、局所構造が重要であり、特にヌクレオチド結合蛋白質を認識しやすいことが明らかとなった。第4章では、相互作用相手ではなく、蛋白質認識に対するカテキンの化学構造の特徴を記述する。

Figure 47 に示したように、HSA-EGCg および Ovalbumin-EGCg の相互作用に伴う熱力学パラメーターは異なる。その一方で、親和性を示す ΔG は同程度である。すなわち、同程度の親和性を異なる結合様式で生み出している可能性が示唆される。では、他のカテキン類について、相互作用における親和性、結合様式は HSA と異なる傾向を示すのであろうか。そこで、カテキンの化学構造に依存した他分子認識機構を示すか否かを検証することとした (Figure 67)。

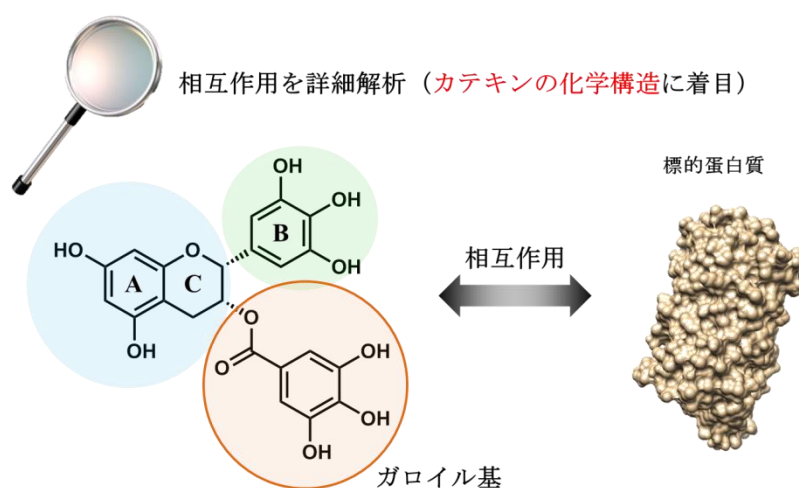


Figure 67. 本研究の目的

4.2 Ovalbumin とカテキン類との相互作用解析

4.2.1 親和性および熱力学パラメーターの取得

カテキン 8 種と Ovalbumin との相互作用解析を行った。

【試料調製】

◆Ovalbumin

Ovalbumin は市販品を 5°C、12h 透析し、適当な濃度とすることで調製した。

◆カテキン 8 種

カテキン類は市販品を Buffer に溶解し、適当な濃度に調製した。

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：50-150 μ M HSA

シリンジ：500-1500 μ M 各種カテキン類

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

Ovalbumin とカテキン類との相互作用解析の結果、すべてのカテキン類と相互作用する一方で、異なる親和性、熱力学パラメーターを示すことが明らかとなった (Figure 68, Table 10)。

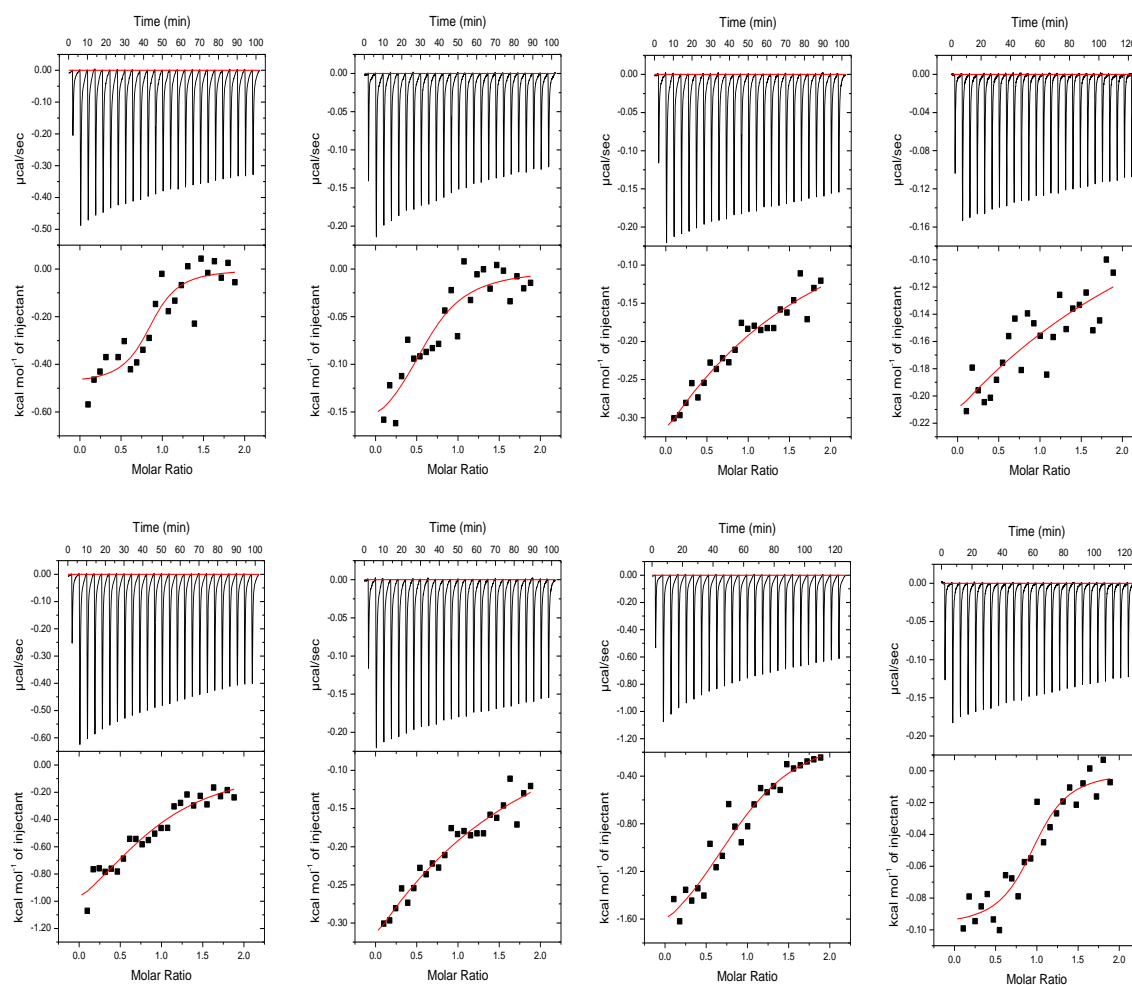


Figure 68. 8種カテキン類と Ovalbumine との相互作用に伴う熱力学的解析結果

(A) EGCg, (B) EGC, (C) GCg, (D) GC, (E) ECg, (F) EC, (G) Cg, (H) C

Table 10. Ovalbumin とカテキン間の相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	$\Delta H/\Delta G(\%)$	N
EGCg	1.8	-0.5	-7.3	-7.8	6	0.9
EGC	20.5	-0.2	-6.2	-6.4	3	0.6
GCg	23.6	-1.5	-4.8	-6.3	23	0.9
GC	452.5	-1.3	-3.3	-4.6	28	1.0 ^a
ECg	83.3	-4.1	-1.5	-5.6	73	1.0 ^a
EC	1766.8	-2.7	-1.0	-3.7	72	1.0 ^a
Cg	12.8	-2.0	-4.6	-6.7	30	1.0
C	7.5	-0.1	-6.9	-7.0	1	1.0

a) 親和性が低いため、結合比 N を 1 と仮定した結果

Ovalbumin は HSA 同様にすべてのカテキン類に相互作用する一方で、親和性および熱力学パラメーターが異なることが明らかとなった。親和性の低いカテキン類以外の親和性がある程度高いカテキン類において、エントロピー駆動型の相互作用様式を示した。HSA-EGCg 間の相互作用様式はエンタルピー駆動型であったのに対して、Ovalbumin-EGCg においてはエントロピー駆動型であり結合様式が異なる。その一方で、ガロイル基の有無で大きく親和性が異なる傾向があることが明らかとなり、このことは HSA 同様の傾向であった。また、ガロイル基を有するカテキン類の方が、エンタルピー得となることも明らかとなり、直接的な結合形成を生じる官能基であることがうかがえた (Figure 69)。

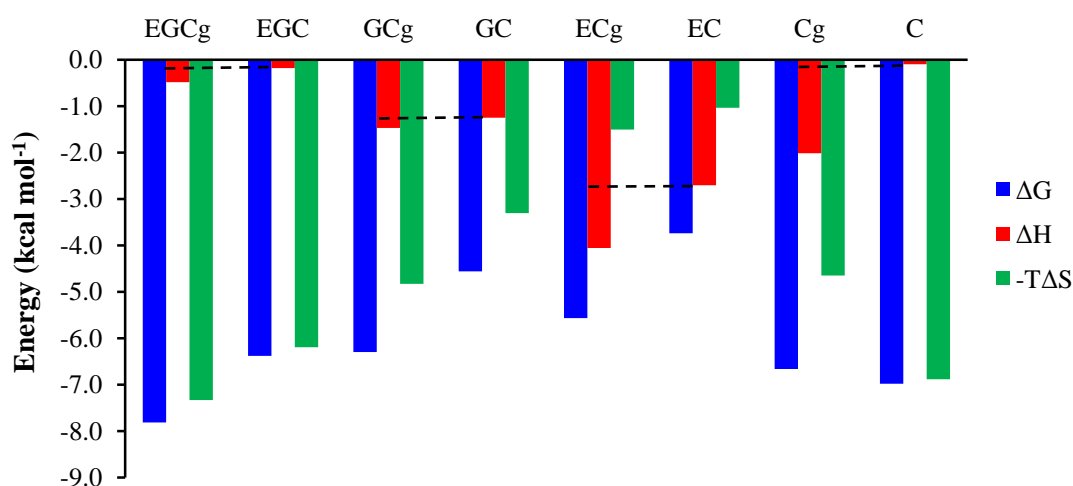


Figure 69. 8種カテキン類と Ovalbumin との相互作用に伴う熱力学パラメーター

また、Figure. 70 で示すように、カテキンの B 環の水酸基が 3 つのピロガロール骨格の場合、2, 3 位水素が *cis* 型であるエピ体の方が、親和性が高いことが明らかとなった。その一方で、

B 環の水酸基が 2 つのカテコール骨格の場合、2, 3 位 *trans* 型である非エピ体の方が、親和性が高いことが明らかとなった。つまり、化学構造依存的な蛋白質認識機構が存在することを見出した。

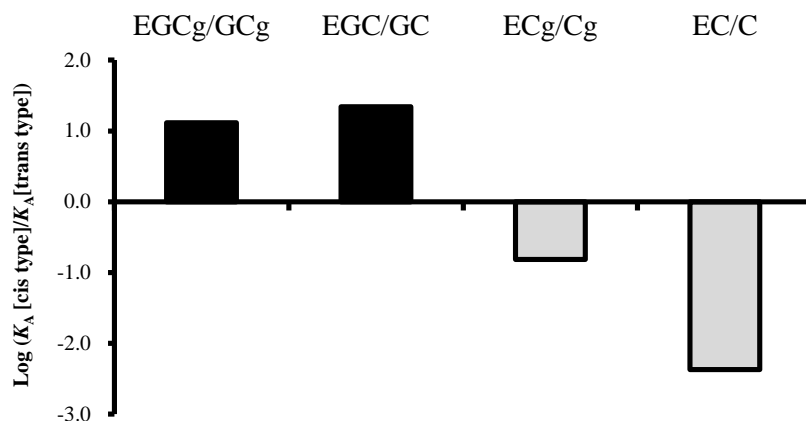


Figure 70. カテキンの化学構造と親和性の関係性

4.2.2 結合部位の相同性の検証

物質間の相互作用を理解するうえで、結合部位を知ることは大変有用であると考えられる。つまり、Ovalbumin のどの部位へカテキン類が相互作用しているかということが重要である。Wang らは蛍光測定によって、Ovalbumin に caffeine、theophylline などのアルカロイド類が結合することを明らかにしている⁸⁹。また、Ognjenovic⁹⁰らは、Ovalbumin と caffeine および EGCg が結合するサイトは、IgE が結合するサイトであることを提唱している (Figure. 71)⁹⁰。そこで我々は、ITC を用いた caffeine との competitive assay を行うことで、結合サイトの妥当性を検証した。

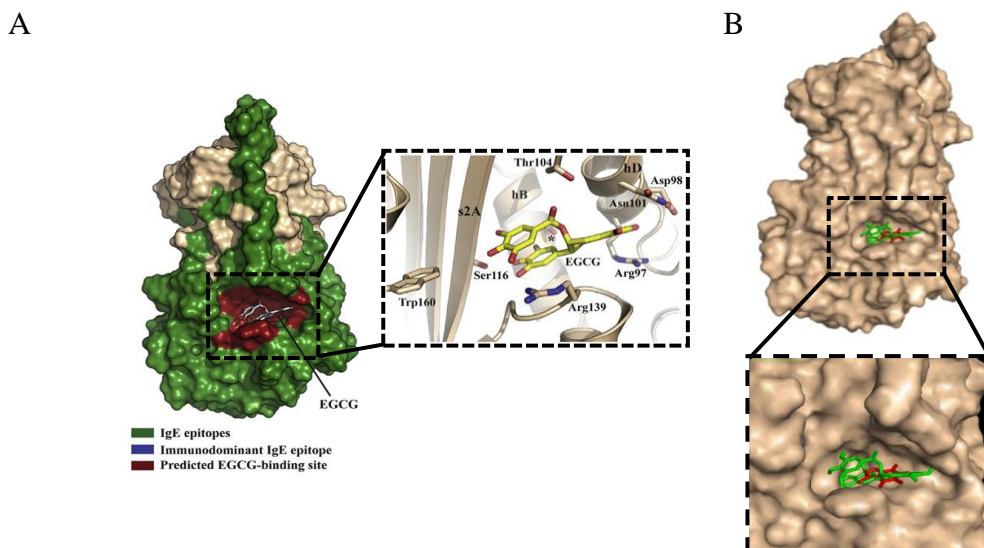


Figure 71. Ovalbumin への EGCg 予測結合部位⁹⁰

(A) Ovalbumin への EGCg 予測結合部位、(B) EGCg と Caffeine の予測結合部位

4.2.2.1 EGCg と Caffeine との Competitive assay

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：100 μ M Ovalbumin or 100 μ M Ovalbumin-100 μ M EGCg

シリンジ：1000 μ M Caffeine

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

Ovalbumin と Caffeine との相互作用において見られた発熱反応が Ovalbumin-EGCg 複合体と Caffeine との相互作用においては、吸熱反応に転じた (Figure 72)。EGCg と Caffeine の結合サイトが競合しない場合、同様の発熱反応を示すと考えられる。その一方で、EGCg と Caffeine が競合する場合、Caffeine と Ovalbumin の相互作用に伴う発熱反応が見られないことが予想される。つまり、本測定の結果は、EGCg と caffeine は競合するため、caffeine が Ovalbumin に本来結合する位置に結合できないと考えられ、吸熱反応を示したことから、非特異的相互作用を生じたと考えることが出来る。つまり、EGCg は Ognjenovic'らが提唱するサイトに結合することが示唆された。

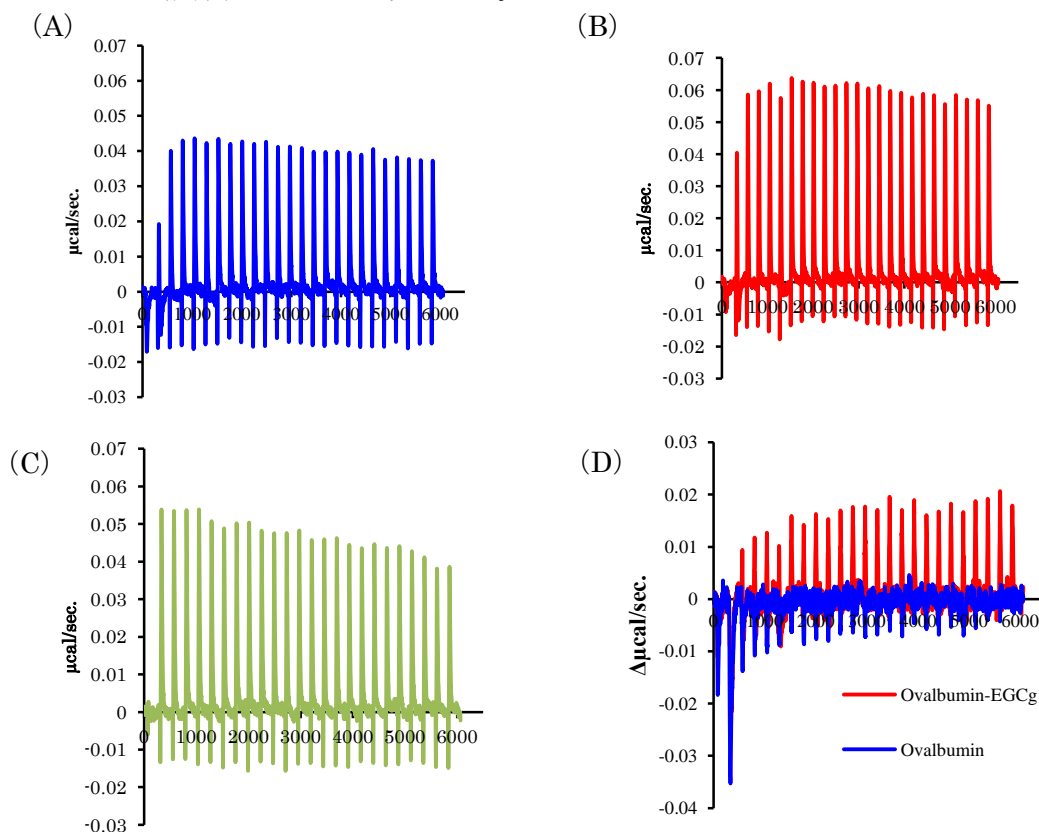


Figure 72. Caffeine と EGCg の Competitive assay

- (A) Ovalbumin vs Caffeine、(B) Ovalbumin-EGCg vs Caffeine、(C) Buffer vs Caffeine
(D) Caffeine の希釈熱との差分

4.2.2.2 EGCg と EGC との Competitive assay

EGCg 以外のカテキン類は同一の位置で結合しているのであろうか。そこで、ガロイル基を有さないカテキンである、EGC と EGCg の Competitive assay を ITC を用いて行った。

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：50 μ M Ovalbumin or 50 μ M Ovalbumin-50 μ M EGCg

シリンジ：500 μ EGC

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

測定の結果、Ovalbumin と EGC との相互作用時にみられた発熱反応がほとんど見られないことから、同一の結合サイトであると考えられる (Figure 73)。

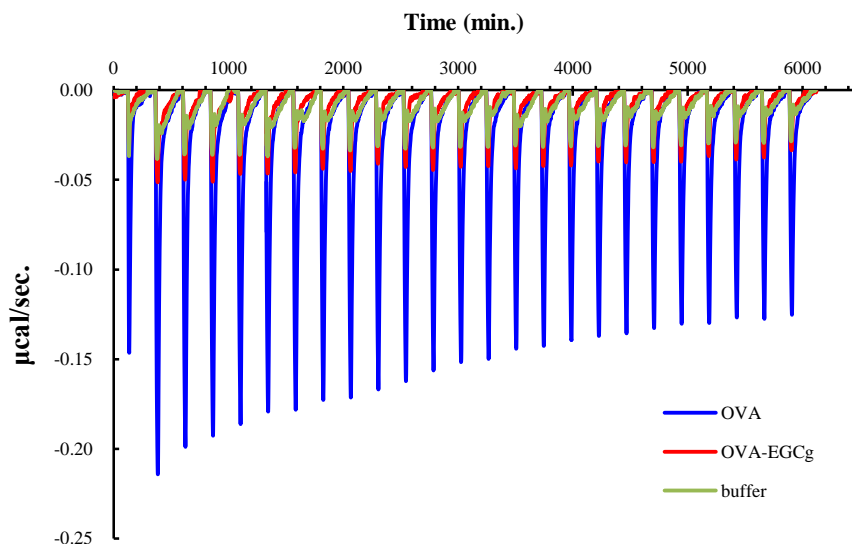


Figure 73. EGCg と EGC の Competitive assay の結果

4.2.2.3 EGCg と EGC の Ovalbumin への相互作用による熱安定性への影響

ポリフェノールが β -lactoglobulin、collagen などと相互作用することによって、構造が変化することが知られている^{91,92}。EGCg の結合に伴う構造変化によって、EGC の結合が阻害されることが考えられる。そこで、DSC を用いて、Ovalbumin、Ovalbumin-EGCg 複合体、Ovalbumin-EGC 複合体における熱安定性を測定することによって、相互作用時の Ovalbumin 立体構造への影響を検証した。

【測定条件】

測定機器：Auto-VP-DSC (Malvern Instruments Limited.)

サンプル：100 μ M Ovalbumin、Ovalbumin – EGCg (1eq.)、Ovalbumin- EGC (1eq.)

速度：1°C min⁻¹

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：30-90°C

【測定結果】

Ovalbumin、Ovalbumin-EGCg 複合体、Ovalbumin-EGC 複合体の DSC 測定結果を Figure 74 に示す。すべてのサンプル間において、熱安定性の指標である T_m に差はほとんど見られなかった。つまり、複合体を形成したことによる立体構造変化は生じていないと考えられる。すなわち、Competitive assay でみられた結果は、EGCg と EGC が同一結合サイトを有することを示唆する結果である。

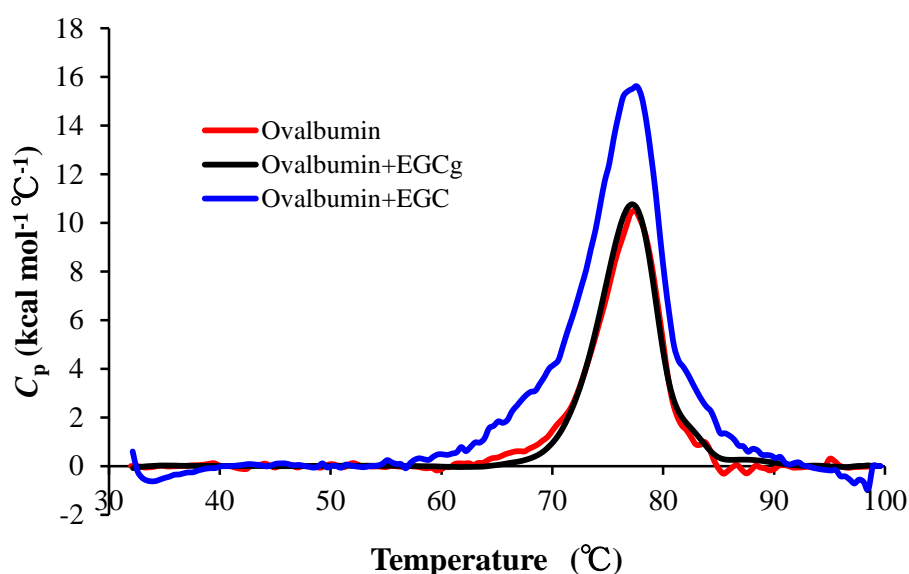


Figure 74. Ovalbumin、Ovalbumin - EGCg or EGC 複合体の DSC 測定結果

4.2.3 結合におけるガロイル基が担う役割

ガロイル基が担う役割を明確にするため、ガロイル基の誘導体である Ethyl gallate およびガロイル基のメチル化誘導体を含む EGCg 誘導体を用いて Ovalbumin との相互作用解析を行った。

4.2.3.1 Ovalbumin と Ethyl gallate との相互作用解析

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：50 μ M Ovalbumin

シリンジ：500 μ M Ethyl gallate

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

Ethyl gallate と Ovalbumin の相互作用においては、EGCg に対して親和性は低下するものの、ガロイル基を有する GCg、Cg と同程度であることから、相互作用に重要な官能基であるといえる (Figure 75、Table 11)。

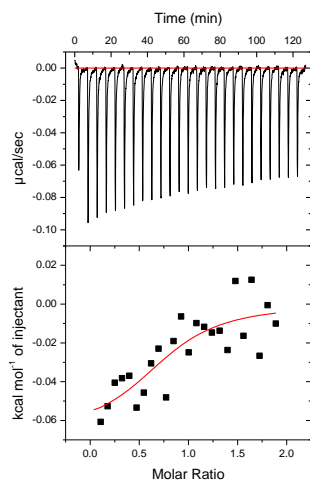


Figure 75. Ethyl gallate と Ovalbumin との ITC 測定結果

Table 11. Ovalbumin とカテキン間の相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	$\Delta H/\Delta G(\%)$	N
Ethyl gallate	25.3	-0.1	-6.2	-6.3	1	0.8

4.2.3.2 Ovalbumin と EGCg メチル化誘導体との相互作用解析

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：50 μM Ovalbumin

シリンジ：500 μM EGCg-3'-O-Me、EGCg-4'-O-Me、EGCg-3''-O-Me、EGCg-4''-O-Me

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

EGCg-3'-O-Me、EGCg-4'-O-Me、EGCg-3''-O-Me、EGCg-4''-O-Me と Ovalbumin との相互作用解析の結果、ガロイル基の水酸基をメトキシ基に置換した際に大きな親和性、熱力学パラメーターの変化が生じた (Figure 75、Table 12)。このことから、改めて他分子を認識する際のガロイル基の重要性が明らかとなった。

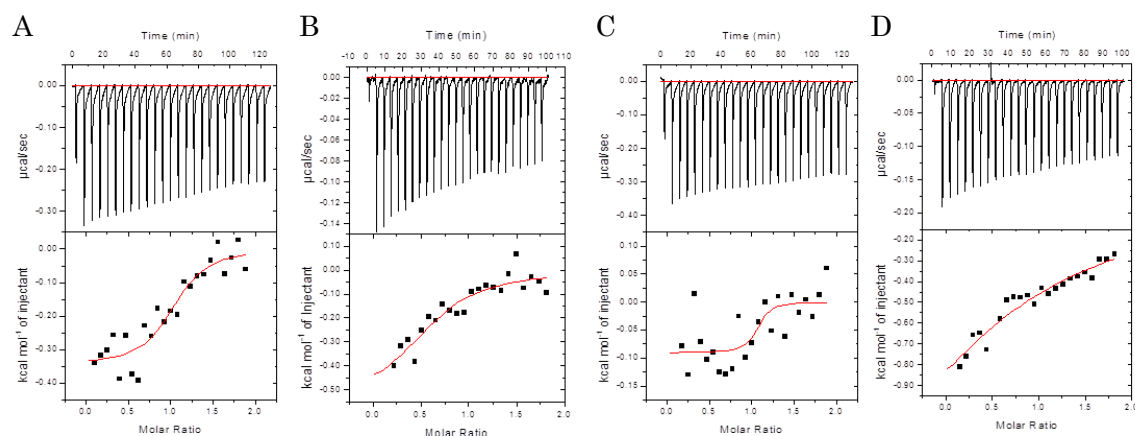


Figure 76. 4種メチル化カテキン類と Ovalbumin との相互作用に伴う熱力学的解析結果
 (A) EGCg-3'-O-Me, (B) EGCg-4'-O-Me, (C) EGCg-3''-O-Me, (D) EGCg-4''-O-Me,

Table 12. Ovalbumin と EGCg メチル化誘導体間の相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	$K_D(\mu\text{M})$	$\Delta H (\text{kcal mol}^{-1})$	$-T\Delta S (\text{kcal mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kcal mol}^{-1})$	N
EGCg	2.2	-4.7	-3.0	-7.7	1.1
EGCg-3'-O-Me	2.0	-0.3	-7.4	-7.8	1.1
EGCg-4'-O-Me	6.7	-0.4	-6.6	-7.0	0.7
EGCg-3''-O-Me	0.3	-0.1	-8.9	-9.0	1.1
EGCg-4''-O-Me	86.2	-2.2	-3.3	-5.5	1.0 ^a

a) 親和性が低いため、結合比 N を 1 と仮定した結果

4.3 様々な蛋白質とガロイル基を有さないカテキン類との相互作用解析

蛋白質の性質によらず、カテキンの化学構造に依存する他分子認識機構が存在することを示唆する結果が得られた。さらに確証づけるため、他の蛋白質においてもガロイル基を有さないカテキンである EGC との相互作用解析を行った。

4.3.1 EGCg 結合蛋白質と EGC との相互作用解析

3.3.2 項にて評価した EGCg 結合蛋白質とガロイル基を有さない EGC との相互作用解析を ITC を用いて行った。

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：50 μM HSA, Ovalbumin, 100 μM α -Lactalbumin, 100 μM α -Casein, 100 μM κ -Casein, 100 μM Conalbumin, 100 μM Lactoferrin, 100 μM Aprotinin, 100 μM Lysozyme

シリンジ：500 μM EGC or 1000 μM EGC

Buffer：50 mM Na-phosphate, pH 6.7

測定温度：25°C

【測定結果】

ITC を用いた相互作用解析の結果、ほとんどの蛋白質において、親和性が低下した (Table 13)。つまり、HSA、Ovalbumin 以外の蛋白質においても、カテキンの化学構造依存的な蛋白質認識機構が存在することが明らかとなった。その一方で、Lactoferrin において、ガロイル基を介さない親和性創出機構が存在することを示唆する結果が得られた。この親和性創出機構についての詳細な要因は現状、明らかにできていない。

Table 13. 様々な蛋白質と EGC 間の相互作用における熱力学的パラメーター

Compound	K_D (μM)	ΔH (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S$ (kcal mol^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	$\Delta H/\Delta G$ (%)	N
HSA	19.5	-0.6	-5.8	-6.3	9	0.9
Ovalbumin	20.5	-0.2	-6.2	-6.4	3	0.6
α -Lactalbumin	N.B.	—	—	—	—	—
α -Casein	N.B.	—	—	—	—	—
κ -Casein	N.B.	—	—	—	—	—
Conalbumin	201.6	-0.6	-4.5	-5.0	11	1.0 ^a
Lactoferrin	15.3	-0.3	-6.3	-6.6	4	1.0 ^a
Aprotinin	N.B.	—	—	—	—	—
Lysozyme	N.B.	—	—	—	—	—

a) 親和性が低いいため、結合比 N を 1 と仮定した結果、N.B.: Not Binding

4.3.2 ERK2 と EGC との相互作用解析

3.3.3 項にて ERK2 と EGCg が相互作用することを示した。そこで、ガロイル基を有さないカテキン類である EGC において、ERK2 と相互作用するか否かの検証を ITC および DSF を用いて行った。

4.3.2.1 ITC 測定

【測定条件】

測定機器：VP-ITC (Malvern Instruments Limited.)

セル：15 μ ERK2

シリンジ：150 μ M EGC

Buffer：25mM HEPES, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH7.5

測定温度：25°C

【測定結果】

ERK2 と EGC との相互作用解析を行ったところ、EGCg において見られていた発熱反応がガロイル基を有さない EGC では見られず、相互作用していないことが明らかとなった (Figure 77)。EGCg は ERK2 の ATP 結合サイトを認識し結合していると考えられるが、ガ

ロイル基を有さない EGC においては ERK2 と相互作用が見られないことから、ATP 結合サイトの認識においてもガロイル基が果たす役割は大きいと考えられる。

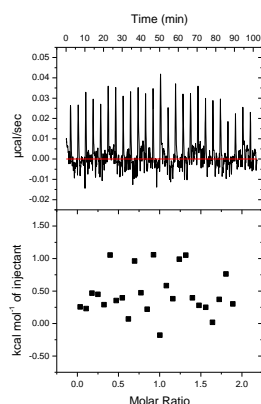


Figure 77. ERK2 と EGC との ITC 測定

4.3.2.2 DSF 測定

EGCg との相互作用によってみられた ERK2 の変性現象が EGC においても見られるか否かを DSF を用いて検証を行った。

【測定条件】

測定機器：CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System(BIO RAD, USA)

測定試料：4 μ M ERK2、4 μ M ERK2 + 40 μ EGC

Buffer：25mM HEPES-HCl-NaOH, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1/100×SYPRO ORANGE、

測定温度範囲：10°C-95°C、昇温速度 0.2°C/秒

【測定結果】

ERK2 と EGC との相互作用解析を DSF を用いて行ったところ、EGCg において見られていた ERK2 の変性現象が EGC では見られず、ITC 測定同様に、EGC は ERK2 に相互作用していないことが明らかとなった (Figure 78)。

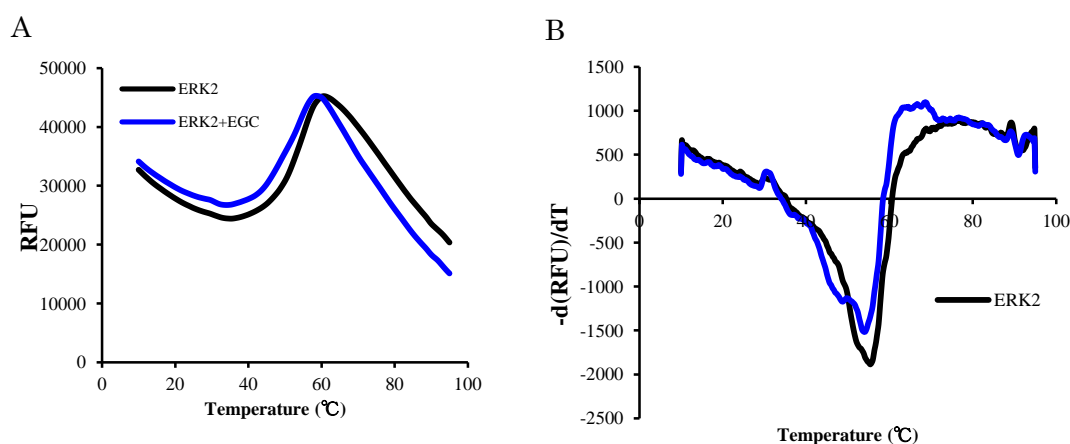


Figure 78. ERK2 と EGC の相互作用解析 (DSF)

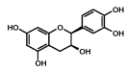
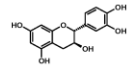
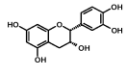
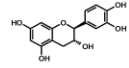
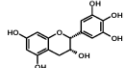
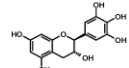
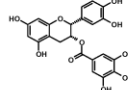
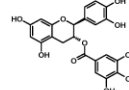
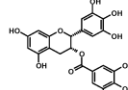
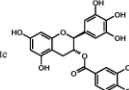
(A) 温度変化に対する蛍光強度の変化、(B) (A) の時間に対する蛍光強度変化

4.3.3 データベースを用いた標的蛋白質とカテキン類との相互作用

Pubchem を用いたデータベース検索において見出された EGCg の標的蛋白質に対して、入手可能な参照論文 32 報を元に^{22, 93-122}、結合様式に関する情報を調査した結果、記載のあった参照論文は 18 報あり、その中の 17 報において、ガロイル基が親和性の獲得に重要な官能基であることを示唆する結果が得られていた^{94,95, 96-102, 101, 109, 111-113, 116, 117, 119, 122}。Tasdmir らは、脂肪酸合成酵素である FabG、FabZ、FabI および熱帯熱マラリア原虫 *P. falciparum* の chloroquine 感受性、耐性株に対しての各種カテキン類の構造活性相関を行ったところ、ガロイル基を有するカテキン類においてのみ活性を示す一方で、Cg においては、その他のガロイル基を有する化合物に比べ、活性が強いことが明らかとなっており、活性制御には、ガロイル基およびその他の化学構造に明確な認識機構の違いがあることが明らかとなった。(Table 14)¹⁰¹。

Table 14. 標的蛋白質に対するカテキン類の構造活性相関¹⁰¹

Table 2. In Vitro Activity of Catechins against FabG, FabZ, FabI and Chloroquine-Sensitive (NF54) and -Resistant (K1) *P. falciparum* Strains

compd name	IC ₅₀ (μM)					compd name	IC ₅₀ (μM)						
	FabG	FabZ	FabI	P.f. NF54 ^a	P.f. K1		FabG	FabZ	FabI	P.f. NF54	P.f. K1		
29 (+)-epicatechin		n.a. ^b	n.a.	n.a.	>150	n.d. ^c	34 (+)-catechin		n.a.	n.a.	n.a.	144.0	n.d.
30 (-)-epicatechin		n.a.	n.a.	n.a.	>150	n.d.	35 (-)-catechin		n.a.	n.a.	n.a.	>150	n.d.
31 (-)-epigallocatechin		n.a.	n.a.	n.a.	>150	n.d.	36 (-)-gallocatechin		n.a.	n.a.	n.a.	>150	n.d.
32 (-)-epicatechin gallate		1.0	0.4	0.2	40.0	11.3	37 (-)-catechin gallate		1.0	0.4	0.3	3.2	0.4
33 (-)-epigallocatechin gallate		0.3	0.4	0.2	25.5	9.9	38 (-)-gallocatechin gallate		1.1	0.6	0.5	40.1	6.2

^a Artemisinin was used as the reference standard (IC₅₀: 0.002 μg/mL). ^b n.a. means that the compound was not active when measured at a concentration of 100 μM. ^c n.d. means not determined.

また、Shin らは、NADP⁺の還元を触媒する Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase、6-phosphate 1-dehydrogenase、isocitrate dehydrogenase に対するカテキン類の構造活性相関を行ったところ、ガロイル基を有するカテキン類の方が活性が高いことを明らかにしている (Table 15)¹¹¹。

Table 15. 各種カテキン類における G6PD、6PGD、IDH に対する IC₅₀¹¹¹

Compound	General structure	R1	R2	IC ₅₀ (μmol/L)		
				G6PD	6PGD	IDH
EC	A	H	H	≥1000	≥1000	≥1000
EGC	A	OH	H	≥1000	≥1000	≥1000
ECG	A	H	3,4,5-Trihydroxybenzoyl	0.18 ± 0.01	1.21 ± 0.13	10.8 ± 1.66
EGCG	A	OH	3,4,5-Trihydroxybenzoyl	0.25 ± 0.02	0.72 ± 0.07	6.44 ± 1.12
CG	B	H	3,4,5-Trihydroxybenzoyl	0.24 ± 0.01	1.28 ± 0.08	6.62 ± 0.63
GCG	B	OH	3,4,5-Trihydroxybenzoyl	0.23 ± 0.02	1.45 ± 0.08	2.72 ± 0.21
GC	B	OH	H	≥1000	≥1000	≥1000
C	B	H	H	≥1000	≥1000	≥1000

4.4 本研究のまとめ

様々な蛋白質に対して、カテキンの化学構造に依存した他分子認識機構が存在するか否かを検証した結果、HSA と同様にガロイル基が他分子認識における親和性獲得、エンタルピーの創出に大きな役割を担っていることが明らかとなった。また、特定の蛋白質 (Ovalbumin) においては、B 環の水酸基 1 つの違い、ガロイル基の水酸基 1 つの違いなどで親和性に大きな違いがあることも明らかとなり、カテキンの化学構造に依存した親和性の獲得機構が存在することが明らかとなった (Figure 79)。

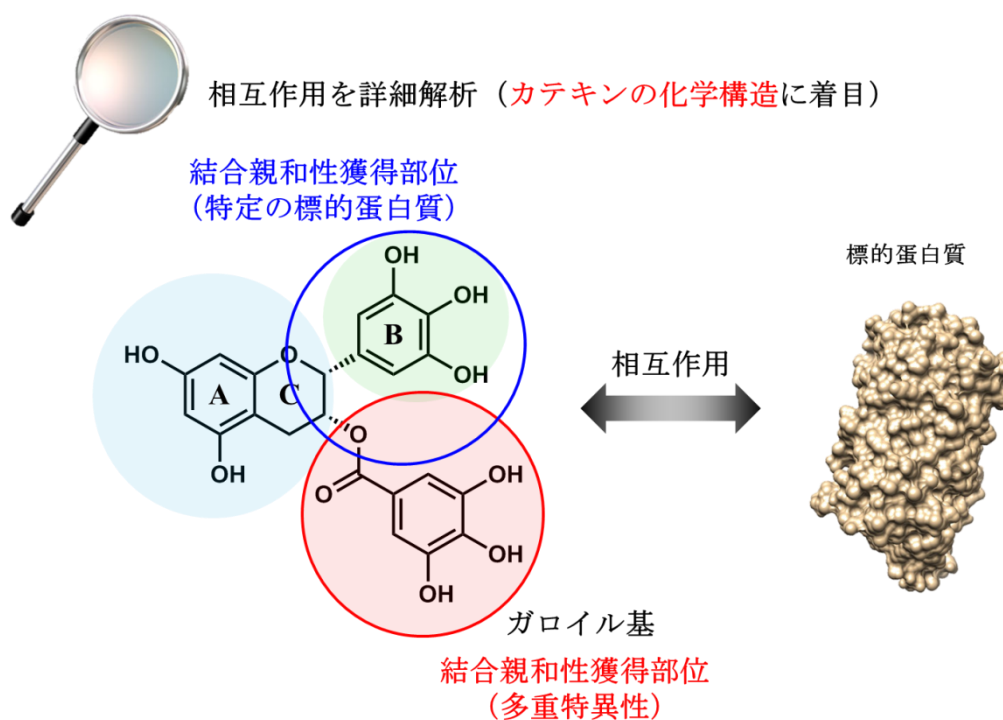


Figure 79. カテキンの化学構造に依存した他分子認識機構

第 5 章

総括および今後の展望

第5章 総括および今後の展望

5.1 本研究のまとめ

食品に含まれる機能性成分である茶カテキンは様々な生理機能を示すことが知られている。茶カテキンがもつこれら機能は、様々な標的蛋白質を有することから発現されると考えられている。では、なぜこのように多様な標的蛋白質、機能を有するのであろうか。我々は、機能発現を生じる所以の一つである、茶カテキンが示す蛋白質分子認識機構に着目した。茶カテキンが有する他分子認識機構を理解することで、生理機能を獲得する所以が明らかとなるだけでなく、その機能を制御することもできるのではないかと考えた。つまり、本研究の目標は、茶カテキンの他分子認識機構の解明であり、最終目的としては、理解することで茶カテキンと他分子との相互作用制御を通して、生じる現象の制御を行うことである。この目標を達成するため、まず、モデル蛋白質である血清アルブミンとカテキン類との相互作用解析を通して、評価系の確立を行い、続いて様々な蛋白質との相互作用解析を通して、茶カテキンが有する他分子認識機構を明らかとした。以下に明らかとしたことおよびその意義について考察する。

第2章 茶カテキン-ヒト血清アルブミン (HSA) 間の分子認識機構の解明

本章では、茶カテキンの他分子認識機構の解明を見据え、標的モデル蛋白質としてヒト血清アルブミン (HSA) を用い、系の確立およびHSAの認識機構解明を行った。特に、等温滴定型熱量測定 (ITC) を用いた熱力学的な解析、ドッキングシミュレーションを用いた *in silico* 解析を基盤とした詳細な相互作用解析を行った。その結果、茶カテキンによるHSAの認識機構は、化学構造依存的であり、特に茶カテキンが有するガロイル基が結合親和性を向上させる官能基であることを明らかとした。さらに *in silico* 解析などによる詳細な解析の結果、ガロイル基を有するカテキン類が、より大きな埋没表面積 (BSA)、形状相補性 (S_c) および水素結合の形成による大きなエンタルピーの獲得に強く寄与することを示した。

第3章 異なる物性を有した蛋白質の茶カテキン結合に関する分子認識特性

本章では、第2章で明らかとした、茶カテキンの他分子認識におけるガロイル基の重要性を HSA だけでなく様々な蛋白質を標的とすることで、検証することとした。そこで、「カテキンが熱力学的に認識しやすい蛋白質が存在する」との仮説を立て、生理活性の高い EGCg を用い、蛋白質の物性、構造、機能に着目し解析を ITC を用い、熱力学的解析によって明らかとした。その結果、蛋白質の等電点や分子量と結合親和性には相関性がない一方で、蛋白質の1アミノ酸変異という局所構造の違いが EGCg との相互作用においては重要であることが明らかとなった。このように、局所構造が大事であることから、オープンソースのケミカルデータベースである Pubchem を用いて EGCg が示す生

理活性に関わる蛋白質の構造およびその機能との関係性を検証することとした。その結果、ヌクレオチドを基質とする蛋白質群が EGCg の標的蛋白質の多くを占めることを明らかとした。そこで、ATP 結合蛋白質である、Extracellular signal-regulated kinase2 (ERK2) を発現、精製し相互作用解析を行った結果、EGCg は特異的かつ高親和性を示すことを明らかとした。これらのことから、カテキン特に EGCg は他分子を認識する際に明らかに熱力学的に認識しやすい蛋白質が存在することを示唆する結果が得られた。

第4章 蛋白質に対する茶カテキンの官能基レベルにおける分子認識特性

本章において、第3章で明らかとなった、EGCgに対する他分子認識特性が、カテキンの化学構造依存的な他分子認識機構に適用されるか否かの検証を、ガロイル基の有無、カテキンの立体構造、B環の水酸基の数など、カテキンの化学構造視点で行った。その結果、ガロイル基においては、HSA以外の他分子においても結合親和性を獲得する部位であることが明らかとなった。また、カテキンの化学構造においてもOvalbuminを標的蛋白質とした際に、親和性の大小を左右する重要な因子であることが明らかとなった。

本研究を通して、これまで明らかにされていなかった、他分子を認識する際のガロイル基の特性を熱力学を基盤とした解析を用いることで明らかにした。また、ガロイル基が他分子との結合に柔軟に対応可能な官能基であるのに対して、カテキン類のA, B, C環である共通骨格が他分子を認識する際の特異性を創出している官能基であることを示唆する結果が得られた。

このように、カテキン1分子がもつそれぞれの官能基は他分子認識における特異性を生み出している^{123, 124}。抗体分野においては、2つの異なる抗原を認識する二重特異性抗体が知られている。分子内にそれぞれ2つの異なる抗原を認識するアミノ酸配列を有していることが特徴である。つまり、カテキンにおいてもガロイル基または、ガロイル基とA,B,C環との組み合わせといった他分子を認識する機構を変え、様々な構造特徴を持った分子を認識する多重特異性のある分子であることを示唆する結果が得られた。本研究により、茶カテキンが有する機能解明に大きく貢献すると考える。

5.2 今後の展望

5.2.1 カテキンの化学構造と標的蛋白質が示す機能への影響との関係性

本研究において、カテキン類は様々な蛋白質と相互作用することが明らかとなった。その一方で、カテキンと相互作用することによって標的蛋白質が示す機能およびカテキンが有する機能（生理活性、苦渋味、ラジカル消去活性、アミロイド繊維化など）に対してどのような影響があるかについては、本研究において着手できていない。1.6項で示したように、本研究の最終目的は標的蛋白質の機能およびカテキンの機能を制御することであり、両者間の相互作用を理解して初めてアプローチできると考えている。ここでいう制御とは、

ある現象を促進させるまたは抑制させるなど、自在に扱えるということである。本技術が生かせる場としては、医薬分野に限らず、本博士論文の冒頭で述べたように食品分野にも適応可能であると考えている。食品素材において、活性を高めようとした際に化学構造を修飾するなどのアプローチが安全性上ほぼ不可能であると考え、両者間の相互作用を構造および熱力学的に理解することで、最適な第3成分を系に添加することによって制御することが出来るのではないかと推察できる。実際に、HSA-EGC間の相互作用はエントロピー駆動であり、NaClを系に添加することによって両者間の結合親和性を向上させることが出来る。つまり制御することが可能となることを証明した。今後は、ある標的蛋白質をターゲットにまずは両者間の相互作用を詳細に理解し、制御する技術に転用していきたいと考えている。

5.2.2 カテキンと標的分子の速度論解析、ダイナミクス解析

本研究によって、カテキン類の化学構造は、様々なカテキン類に共通骨格であるA, B, C間と結合親和性を稼ぐガロイル基で大きく特性が異なることが明らかとなった。では、標的分子に対して、両官能基が、どのような速度論、ダイナミクス（相互作用時の動き）をもって相互作用しているのかを解析することで、それによって標的蛋白質が示す機能およびカテキンの機能に影響が出るか否かを検証したいと考えている。その考えに至った根拠としては、蛋白質-カテキン共結晶構造の報告例は少ないが、カテキン単独の最安定構造とは異なる構造がみられる。すなわち、そこにはカテキンの動き、それによって誘起される蛋白質の動きがあるのではないかと考えている。具体的には、表面プラズモン共鳴法、分子動力学計算などを用いることで、相互作用する過程を定量的に解析したいと考えている。

参考文献

1. Swinbanks, P., Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* **1993**, *364*(15), 180.
2. Varma, M. V. S.; Obach, R. S.; Rotter, C.; Miller, H. R.; Chang, G.; Steyn, S. J.; El-Kattan, A.; Troutman, M. D., Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*(3), 1098-1108.
3. Freitas, A. C.; Rodrigues, D.; Rocha-Santos, T. A. P.; Gomes, A. M. P.; Duarte, A. C., Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. *Biotechnology advances* **2012**, *30*(6), 1506-1515.
4. 中根実, 分子標的薬と低分子阻害剤. *薬局* **2010**, *61*, 173-179.
5. Evans, J. B.; Syed, B. A., Next-generation antibodies. Nature Publishing Group: 2014.
6. Scott, A. M.; Wolchok, J. D.; Old, L. J., Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*(4), 278.
7. Phizicky, E. M.; Fields, S., Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological reviews* **1995**, *59*(1), 94-123.
8. Aswar, U.; Shintre, S.; Chepurwar, S.; Aswar, M., Antiallergic effect of piperine on ovalbumin-induced allergic rhinitis in mice. *Pharmaceutical biology* **2015**, *53*(9), 1358-1366.
9. Ladbury, J. E.; Klebe, G.; Freire, E., Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nature reviews Drug discovery* **2010**, *9*(1), 23.
10. Tarcsay, Á.; Keserű, G. M., Is there a link between selectivity and binding thermodynamics profiles? *Drug discovery today* **2015**, *20*(1), 86-94.
11. Kawasaki, Y.; Freire, E., Finding a better path to drug selectivity. *Drug discovery today* **2011**, *16*(21-22), 985-990.
12. Kawasaki, Y.; Sekiguchi, M.; Kawasaki, M.; Hirakura, Y., Thermodynamic evaluation of the binding of bisphosphonates to human farnesyl pyrophosphate synthase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *62*(1), 77-83.
13. Lacroix, S.; Badoux, J. K.; Scott-Boyer, M.-P.; Parolo, S.; Matone, A.; Priami, C.; Morine, M. J.; Kaput, J.; Moco, S., A computationally driven analysis of the polyphenol-protein interactome. *Scientific reports* **2018**, *8*(1), 2232.
14. Kumazawa, S.; Taniguchi, M.; Suzuki, Y.; Shimura, M.; Kwon, M.-S.; Nakayama, T., Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of agricultural and food chemistry* **2002**, *50*(2), 373-377.
15. Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A., Identification of the 100 richest

- dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition* **2010**, *64* (S3), S112.
16. Vатtem, D. A.; Maitin, V., *Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications*. DEStech Publications, Inc: 2015.
 17. Khan, N.; Mukhtar, H., Tea polyphenols for health promotion. *Life sciences* **2007**, *81* (7), 519-533.
 18. Mori, S.; Miyake, S.; Kobe, T.; Nakaya, T.; Fuller, S. D.; Kato, N.; Kaihatsu, K., Enhanced anti-influenza A virus activity of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate fatty acid monoester derivatives: Effect of alkyl chain length. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2008**, *18* (14), 4249-4252.
 19. Kowalinski, E.; Zubieta, C.; Wolkerstorfer, A.; Szolar, O. H. J.; Ruigrok, R. W. H.; Cusack, S., Structural analysis of specific metal chelating inhibitor binding to the endonuclease domain of influenza pH1N1 (2009) polymerase. *PLoS pathogens* **2012**, *8* (8), e1002831.
 20. Tanaka, T.; Ishii, T.; Mizuno, D.; Mori, T.; Yamaji, R.; Nakamura, Y.; Kumazawa, S.; Nakayama, T.; Akagawa, M., (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses growth of AZ521 human gastric cancer cells by targeting the DEAD-box RNA helicase p68. *Free Radical Biology and Medicine* **2011**, *50* (10), 1324-1335.
 21. Bohin, M. C.; Roland, W. S. U.; Gruppen, H.; Gouka, R. J.; van der Hijden, H. T. W. M.; Dekker, P.; Smit, G.; Vincken, J.-P., Evaluation of the bitter-masking potential of food proteins for EGCG by a cell-based human bitter taste receptor assay and binding studies. *Journal of agricultural and food chemistry* **2013**, *61* (42), 10010-10017.
 22. Bulic, B.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E., Progress and developments in tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56* (11), 4135-4155.
 23. de Freitas, V.; Mateus, N., Protein/polyphenol interactions: past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16* (6), 724-746.
 24. Ozdal, T.; Capanoglu, E.; Altay, F., A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International* **2013**, *51* (2), 954-970.
 25. Tachibana, H.; Koga, K.; Fujimura, Y.; Yamada, K., A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature structural and molecular biology* **2004**, *11* (4), 380.
 26. Tanaka, T.; Watarumi, S.; Fujieda, M.; Kouno, I., New black tea polyphenol having N-ethyl-2-pyrrolidinone moiety derived from tea amino acid theanine: Isolation, characterization and partial synthesis. *Food chemistry* **2005**, *93* (1), 81-87.
 27. Sang, S.; Tian, S.; Wang, H.; Stark, R. E.; Rosen, R. T.; Yang, C. S.; Ho, C.-T., Chemical

- studies of the antioxidant mechanism of tea catechins: radical reaction products of epicatechin with peroxy radicals. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2003**, *11* (16), 3371-3378.
28. Milligan, S. A.; Burke, P.; Coleman, D. T.; Bigelow, R. L.; Steffan, J. J.; Carroll, J. L.; Williams, B. J.; Cardelli, J. A., The green tea polyphenol EGCG potentiates the Antiproliferative activity of c-met and epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer cells. *Clinical Cancer Research* **2009**, 1078-0432.
 29. Nakayama, M.; Shimatani, K.; Ozawa, T.; Shigemune, N.; Tomiyama, D.; Yui, K.; Katsuki, M.; Ikeda, K.; Nonaka, A.; Miyamoto, T., Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **2015**, *79* (5), 845-854.
 30. Narukawa, M.; Noga, C.; Ueno, Y.; Sato, T.; Misaka, T.; Watanabe, T., Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochemical and biophysical research communications* **2011**, *405* (4), 620-625.
 31. Poncet-Legrand, C.; Edelmann, A.; Putaux, J. L.; Cartalade, D.; Sarni-Manchado, P.; Vernhet, A., Poly (L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* **2006**, *20* (5), 687-697.
 32. Ghuman, J.; Zunszain, P. A.; Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Otagiri, M.; Curry, S., Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of molecular biology* **2005**, *353* (1), 38-52.
 33. Wardell, M.; Wang, Z.; Ho, J. X.; Robert, J.; Ruker, F.; Ruble, J.; Carter, D. C., The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, *291* (4), 813-819.
 34. Pal, S.; Saha, C., A review on structure-affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2014**, *32* (7), 1132-1147.
 35. Ishii, T.; Ichikawa, T.; Minoda, K.; Kusaka, K.; Ito, S.; Suzuki, Y.; Akagawa, M.; Mochizuki, K.; Goda, T.; 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* **2011**, *75* (1), 100-6.
 36. Ishii, T.; Minoda, K.; Bae, M. J.; Mori, T.; Uekusa, Y.; Ichikawa, T.; Aihara, Y.; Furuta, T.; Wakimoto, T.; Kan, T., Binding affinity of tea catechins for HSA: Characterization by high - performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Molecular nutrition & food research* **2010**, *54* (6), 816-822.

37. Zinellu, A.; Sotgia, S.; Scanu, B.; Pisanu, E.; Giordo, R.; Cossu, A.; Posadino, A. M.; Carru, C.; Pintus, G., Evaluation of non-covalent interactions between serum albumin and green tea catechins by affinity capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **2014**, *1367*, 167-71.
38. Hatasa, Y.; Chikazawa, M.; Furuhashi, M.; Nakashima, F.; Shibata, T.; Kondo, T.; Akagawa, M.; Hamagami, H.; Tanaka, H.; Tachibana, H., Oxidative Deamination of Serum Albumins by (-)-Epigallocatechin-3-O-Gallate: A Potential Mechanism for the Formation of Innate Antigens by Antioxidants. *PloS one* **2016**, *11* (4), e0153002.
39. Li, X.; Wang, S., Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *New Journal of Chemistry* **2015**, *39* (1), 386-395.
40. Kastritis, P. L.; Bonvin, A. M. J. J., On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *Journal of The Royal Society Interface* **2013**, *10* (79), 20120835.
41. Choudhary, S.; Kishore, N., Unraveling the energetics and mode of the recognition of antibiotics tetracycline and rolitetracycline by bovine serum albumin. *Chemical biology & drug design* **2012**, *80* (5), 693-705.
42. Sengupta, B.; Sengupta, P. K., Binding of quercetin with human serum albumin: a critical spectroscopic study. *Biopolymers* **2003**, *72* (6), 427-434.
43. Banerjee, T.; Singh, S. K.; Kishore, N., Binding of naproxen and amitriptyline to bovine serum albumin: biophysical aspects. *The Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (47), 24147-24156.
44. Mayer, M.; Meyer, B., Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123* (25), 6108-6117.
45. Angulo, J.; Nieto, P. M., STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules—a quantitative approach. *European biophysics journal* **2011**, *40* (12), 1357-1369.
46. Lepre, C. A.; Moore, J. M.; Peng, J. W., Theory and applications of NMR-based screening in pharmaceutical research. *Chemical reviews* **2004**, *104* (8), 3641-3676.
47. Mayer, M.; Meyer, B., Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, *38* (12), 1784-1788.
48. Meyer, B.; Peters, T., NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42* (8), 864-890.

49. Hajduk, P. J.; Greer, J., A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature reviews Drug discovery* **2007**, *6*(3), 211.
50. Sánchez - Pedregal, V. M.; Reese, M.; Meiler, J.; Blommers, M. J. J.; Griesinger, C.; Carlomagno, T., The INPHARMA method: protein - mediated interligand NOEs for pharmacophore mapping. *Angewandte Chemie* **2005**, *117*(27), 4244-4247.
51. Ono, K.; Takeuchi, K.; Ueda, H.; Morita, Y.; Tanimura, R.; Shimada, I.; Takahashi, H., Structure - based approach to improve a small - molecule inhibitor by the use of a competitive peptide ligand. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53*(10), 2597-2601.
52. Sugiki, T.; Furuita, K.; Fujiwara, T.; Kojima, C., Current NMR Techniques for Structure-Based Drug Discovery. *Molecules* **2018**, *23*(1).
53. Lemmon, G.; Meiler, J., Rosetta Ligand docking with flexible XML protocols. In *Computational Drug Discovery and Design*, Springer: 2012; pp 143-155.
54. Landrum, G., RDKit: Open-source cheminformatics. 2006. *Google Scholar* **2006**.
55. Wang, C.; Bradley, P.; Baker, D., Protein-protein docking with backbone flexibility. *Journal of molecular biology* **2007**, *373*(2), 503-519.
56. Hubbard, S. J.; Thornton, J. M., NACCESS-Computer Program. 1993. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London*.
57. Koshland Jr, D. E., The key-lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1995**, *33*(23 - 24), 2375-2378.
58. Leaver-Fay, A.; Tyka, M.; Lewis, S. M.; Lange, O. F.; Thompson, J.; Jacak, R.; Kaufman, K. W.; Renfrew, P. D.; Smith, C. A.; Sheffler, W., ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. In *Methods in enzymology*, Elsevier: 2011; Vol. 487, pp 545-574.
59. Kuroda, D.; Gray, J. J., Shape complementarity and hydrogen bond preferences in protein-protein interfaces: implications for antibody modeling and protein-protein docking. *Bioinformatics* **2016**, *32*(16), 2451-2456.
60. Tian, J.; Zhao, Y.; Liu, X.; Zhao, S., A steady - state and time - resolved fluorescence, circular dichroism study on the binding of myricetin to bovine serum albumin. *Luminescence: The journal of biological and chemical luminescence* **2009**, *24*(6), 386-393.
61. Hansch, C.; Leo, A., The log P database. *Claremont, CA: Pomona College* **1987**, 398.
62. Murphy, K. P., Predicting binding energetics from structure: looking beyond DeltaG degrees. *Med Res Rev* **1999**, *19*(4), 333-9.
63. Spolar, R. S.; Record, M. T., Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **1994**, *263*(5148), 777-784.

64. Waldron, T. T.; Murphy, K. P., Stabilization of proteins by ligand binding: application to drug screening and determination of unfolding energetics. *Biochemistry* **2003**, *42* (17), 5058-5064.
65. Zaidi, N.; Ajmal, M. R.; Rabbani, G.; Ahmad, E.; Khan, R. H., A comprehensive insight into binding of hippuric acid to human serum albumin: a study to uncover its impaired elimination through hemodialysis. *PloS one* **2013**, *8*(8), e71422.
66. Quevedo, M. A.; Ribone, S. R.; Moroni, G. N.; Brinon, M. C., Binding to human serum albumin of zidovudine (AZT) and novel AZT derivatives. Experimental and theoretical analyses. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*(6), 2779-2790.
67. 津本浩平; 宇井美穂子, 相互作用の熱力学情報に基づく低分子リガンド設計. *YAKUGAKU ZASSHI* **2009**, *129*(11), 1311-1317.
68. Kyte, J.; Doolittle, R. F., A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **1982**, *157*(1), 105-132.
69. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E., UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* **2004**, *25* (13), 1605-1612.
70. Lemmon, G.; Meiler, J., Rosetta Ligand docking with flexible XML protocols. *Methods Mol Biol* **2012**, *819*, 143-55.
71. Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M., A medicinal chemist's guide to molecular interactions. *Journal of medicinal chemistry* **2010**, *53*(14), 5061-5084.
72. Karp, G., *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons: 2009.
73. Kiyoshi, M.; Caaveiro, J. M. M.; Miura, E.; Nagatoishi, S.; Nakakido, M.; Soga, S.; Shirai, H.; Kawabata, S.; Tsumoto, K., Affinity improvement of a therapeutic antibody by structure-based computational design: generation of electrostatic interactions in the transition state stabilizes the antibody-antigen complex. *PloS one* **2014**, *9*(1), e87099.
74. Lin, Y.; Li, Y.; Song, Z.-G.; Zhu, H.; Jin, Y.-H., The interaction of serum albumin with ginsenoside Rh2 resulted in the downregulation of ginsenoside Rh2 cytotoxicity. *Journal of ginseng research* **2017**, *41* (3), 330-338.
75. Sekula, B.; Zielinski, K.; Bujacz, A., Crystallographic studies of the complexes of bovine and equine serum albumin with 3, 5-diiodosalicylic acid. *International journal of biological macromolecules* **2013**, *60*, 316-324.
76. Hirano, A.; Kameda, T.; Arakawa, T.; Shiraki, K., Arginine-assisted solubilization system for drug substances: solubility experiment and simulation. *The Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114*(42), 13455-13462.
77. Tanaka, K.; Caaveiro, J. M.; Morante, K.; Gonzalez-Manas, J. M.; Tsumoto, K.,

- Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6337.
78. Li, J.; Garg, M.; Shah, D.; Rajagopalan, R., Solubilization of aromatic and hydrophobic moieties by arginine in aqueous solutions. *The Journal of chemical physics* **2010**, *133*(5), 054902.
79. Wang, Y.; Bryant, S. H.; Cheng, T.; Wang, J.; Gindulyte, A.; Shoemaker, B. A.; Thiessen, P. A.; He, S.; Zhang, J., PubChem BioAssay: 2017 update. *Nucleic acids research* **2016**, *45*(D1), D955-D963.
80. Rodriguez-Viciania, P.; Tetsu, O.; Tidyman, W. E.; Estep, A. L.; Conger, B. A.; Santa Cruz, M.; McCormick, F.; Rauen, K. A., Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science* **2006**, *311*(5765), 1287-1290.
81. Eblen, S. T.; Kumar, N. V.; Shah, K.; Henderson, M. J.; Watts, C. K. W.; Shokat, K. M.; Weber, M. J., Identification of novel ERK2 substrates through use of an engineered kinase and ATP analogs. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*(17), 14926-14935.
82. Gavrin, L. K.; Saiah, E., Approaches to discover non-ATP site kinase inhibitors. *MedChemComm* **2013**, *4*(1), 41-51.
83. Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*(5600), 1912-1934.
84. Liao, J. J.-L., Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50*(3), 409-424.
85. Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M., The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature protocols* **2007**, *2*(9), 2212.
86. Ericsson, U. B.; Hallberg, B. M.; DeTitta, G. T.; Dekker, N.; Nordlund, P., Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical biochemistry* **2006**, *357*(2), 289-298.
87. Otori, M.; Kinoshita, T.; Okubo, M.; Sato, K.; Yamazaki, A.; Arakawa, H.; Nishimura, S.; Inamura, N.; Nakajima, H.; Neya, M., Identification of a selective ERK inhibitor and structural determination of the inhibitor-ERK2 complex. *Biochemical and biophysical research communications* **2005**, *336*(1), 357-363.
88. Do Young Lim, S. H. S.; Lee, M.-H.; Malakhova, M.; Kurinov, I.; Wu, Q.; Xu, J.; Jiang, Y.; Dong, Z.; Liu, K.; Lee, K. Y., A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*(23), 35001.
89. Wang, R.-q.; Yin, Y.-j.; Li, H.; Wang, Y.; Pu, J.-J.; Wang, R.; Dou, H.-j.; Song, C.-j.; Wang, R.-y., Comparative study of the interactions between ovalbumin and three alkaloids by

- spectrofluorimetry. *Molecular biology reports* **2013**, *40*(4), 3409-3418.
90. Ognjenović, J.; Stojadinović, M.; Milčić, M.; Apostolović, D.; Vesić, J.; Stambolić, I.; Atanasković-Marković, M.; Simonović, M.; Velickovic, T. C., Interactions of epigallo-catechin 3-gallate and ovalbumin, the major allergen of egg white. *Food chemistry* **2014**, *164*, 36-43.
 91. Kanakis, C. D.; Hasni, I.; Bourassa, P.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Tajmir-Riahi, H.-A., Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* **2011**, *127*(3), 1046-1055.
 92. Zhang, J.; Mi, Q.; Shen, M., Resveratrol binding to collagen and its biological implication. *Food chemistry* **2012**, *131*(3), 879-884.
 93. Wang, R.; Fang, X.; Lu, Y.; Wang, S., The PDBbind database: Collection of binding affinities for protein– ligand complexes with known three-dimensional structures. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47*(12), 2977-2980.
 94. Urusova, D.; Shim, J.; Kim, D.-J.; Jung, S. K.; Zykova, T.; Carper, A.; Bode, A. M.; Dong, Z., Epigallocatechin-gallate suppresses tumorigenesis by directly targeting Pin1. *Cancer prevention research* **2011**, canprevres-0301.
 95. Aihara, Y.; Yoshida, A.; Furuta, T.; Wakimoto, T.; Akizawa, T.; Konishi, M.; Kan, T., Regioselective synthesis of methylated epigallocatechin gallate via nitrobenzenesulfonyl (Ns) protecting group. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19*(15), 4171-4174.
 96. Peach, M. L.; Tan, N.; Choyke, S. J.; Giubellino, A.; Athauda, G.; Burke Jr, T. R.; Nicklaus, M. C.; Bottaro, D. P., Directed discovery of agents targeting the Met tyrosine kinase domain by virtual screening. *Journal of medicinal chemistry* **2009**, *52*(4), 943-951.
 97. Teillet, F.; Boumendjel, A.; Boutonnat, J.; Ronot, X., Flavonoids as RTK inhibitors and potential anticancer agents. *Medicinal research reviews* **2008**, *28*(5), 715-745.
 98. Yang, C. S.; Sang, S.; Lambert, J. D.; Lee, M. J., Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular nutrition & food research* **2008**, *52*(S1), S139-S151.
 99. Robertson, I. M.; Li, M. X.; Sykes, B. D., The solution structure of human cardiac troponin C in complex with the green tea polyphenol:(-)-epigallocatechin-3-gallate. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, jbc-M109.
 100. Tillekeratne, L. M. V.; Sherette, A.; Grossman, P.; Hupe, L.; Hupe, D.; Hudson, R. A., Simplified catechin-gallate inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2001**, *11*(20), 2763-2767.
 101. Tasdemir, D.; Lack, G.; Brun, R.; Rüedi, P.; Scapozza, L.; Perozzo, R., Inhibition of

- Plasmodium falciparum Fatty Acid Biosynthesis: Evaluation of FabG, FabZ, and FabI as Drug Targets for Flavonoids. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49* (11), 3345-3353.
102. Belluti, F.; Perozzo, R.; Lauciello, L.; Colizzi, F.; Kostrewa, D.; Bisi, A.; Gobbi, S.; Rampa, A.; Bolognesi, M. L.; Recanatini, M.; Brun, R.; Scapozza, L.; Cavalli, A., Design, synthesis, and biological and crystallographic evaluation of novel inhibitors of Plasmodium falciparum enoyl-ACP-reductase (PfFabI). *J Med Chem* **2013**, *56* (19), 7516-26.
103. Sharma, S. K.; Parasuraman, P.; Kumar, G.; Surolia, N.; Surolia, A., Green tea catechins potentiate triclosan binding to enoyl-ACP reductase from Plasmodium falciparum (PfENR). *Journal of medicinal chemistry* **2007**, *50* (4), 765-775.
104. Menichincheri, M.; Ballinari, D.; Bargiotti, A.; Bonomini, L.; Ceccarelli, W.; D'Alessio, R.; Fretta, A.; Moll, J.; Polucci, P.; Soncini, C., Catecholic flavonoids acting as telomerase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47* (26), 6466-6475.
105. Wang, D.; Wang, F.; Tan, Y.; Dong, L.; Chen, L.; Zhu, W.; Wang, H., Discovery of potent small molecule inhibitors of DYRK1A by structure-based virtual screening and bioassay. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2012**, *22* (1), 168-171.
106. Gourdain, S. p.; Dairou, J.; Denhez, C. m.; Bui, L. C.; Rodrigues-Lima, F.; Janel, N.; Delabar, J. M.; Cariou, K.; Dodd, R. H., Development of DANDYs, new 3, 5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity. *Journal of medicinal chemistry* **2013**, *56* (23), 9569-9585.
107. Moore, J. D.; Potter, A., Pin1 inhibitors: Pitfalls, progress and cellular pharmacology. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2013**, *23* (15), 4283-4291.
108. Masullo, M.; Menegazzi, M.; Di Micco, S.; Beffy, P.; Bifulco, G.; Dal Bosco, M.; Novelli, M.; Pizza, C.; Masiello, P.; Piacente, S., Direct interaction of garcinol and related polyisoprenylated benzophenones of Garcinia cambogia fruits with the transcription factor STAT-1 as a likely mechanism of their inhibitory effect on cytokine signaling pathways. *Journal of natural products* **2014**, *77* (3), 543-549.
109. Abe, I.; Kashiwagi, Y.; Noguchi, H.; Tanaka, T.; Ikeshiro, Y.; Kashiwada, Y., Ellagitannins and hexahydroxydiphenoyl esters as inhibitors of vertebrate squalene epoxidase. *Journal of natural products* **2001**, *64* (8), 1010-1014.
110. Adamska, E.; Plitta, B.; Giel-Pietraszuk, M.; Fedoruk-Wyszomirska, A.; NaskrĘT-Barciszewska, M.; Markiewicz, W. T.; Barciszewski, J. A. N., New cytosine derivatives as inhibitors of DNA methylation.
111. Shin, E. S.; Park, J.; Shin, J.-M.; Cho, D.; Cho, S. Y.; Shin, D. W.; Ham, M.; Kim, J. B.; Lee, T. R., Catechin gallates are NADP⁺-competitive inhibitors of glucose-6-phosphate

- dehydrogenase and other enzymes that employ NADP⁺ as a coenzyme. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2008**, *16*(7), 3580-3586.
112. Mocanu, M.-M.; Ganea, C. a.; Georgescu, L.; Váradi, T.; Shrestha, D.; Baran, I.; Katona, E.; Nagy, P.; Szöllösi, J. n., Epigallocatechin 3-O-gallate induces 67 kDa laminin receptor-mediated cell death accompanied by downregulation of ErbB proteins and altered lipid raft clustering in mammary and epidermoid carcinoma cells. *Journal of Natural Products* **2014**, *77*(2), 250-257.
113. Xu, G.-H.; Kim, Y.-H.; Chi, S.-W.; Choo, S.-J.; Ryoo, I.-J.; Ahn, J.-S.; Yoo, I.-D., Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2010**, *20*(2), 513-515.
114. Xiaokaiti, Y.; Wu, H.; Chen, Y.; Yang, H.; Duan, J.; Li, X.; Pan, Y.; Tie, L.; Zhang, L.; Li, X., EGCG reverses human neutrophil elastase-induced migration in A549 cells by directly binding to HNE and by regulating α 1-AT. *Scientific reports* **2015**, *5*, 11494.
115. Sánchez-del-Campo, L.; Otón, F.; Tárraga, A.; Cabezas-Herrera, J.; Chazarra, S.; Rodríguez-López, J. N., Synthesis and biological activity of a 3, 4, 5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *Journal of medicinal chemistry* **2008**, *51*(7), 2018-2026.
116. Navarro-Perán, E.; Cabezas-Herrera, J.; García-Cánovas, F.; Durrant, M. C.; Thorneley, R. N. F.; Rodríguez-López, J. N., The antifolate activity of tea catechins. *Cancer research* **2005**, *65*(6), 2059-2064.
117. Al-Rashood, S. T.; Aboldahab, I. A.; Nagi, M. N.; Abouzeid, L. A.; Abdel-Aziz, A. A. M.; Abdel-hamide, S. G.; Youssef, K. M.; Al-Obaid, A. M.; El-Subbagh, H. I., Synthesis, dihydrofolate reductase inhibition, antitumor testing, and molecular modeling study of some new 4 (3H)-quinazolinone analogs. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2006**, *14*(24), 8608-8621.
118. Ishii, T.; Mori, T.; Ichikawa, T.; Kaku, M.; Kusaka, K.; Uekusa, Y.; Akagawa, M.; Aihara, Y.; Furuta, T.; Wakimoto, T., Structural characteristics of green tea catechins for formation of protein carbonyl in human serum albumin. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18*(14), 4892-4896.
119. Churches, Q. I.; Caine, J.; Cavanagh, K.; Epa, V. C.; Waddington, L.; Tranberg, C. E.; Meyer, A. G.; Varghese, J. N.; Streltsov, V.; Duggan, P. J., Naturally occurring polyphenolic inhibitors of amyloid beta aggregation. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2014**, *24*(14), 3108-3112.
120. Hudson, S. A.; Ecroyd, H.; Dehle, F. C.; Musgrave, I. F.; Carver, J. A., (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) maintains κ -casein in its pre-fibrillar state without redirecting its aggregation pathway. *Journal of molecular biology* **2009**, *392*(3),

689-700.

121. Porat, Y.; Abramowitz, A.; Gazit, E., Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical biology & drug design* **2006**, *67*(1), 27-37.
122. Carver, J. A.; Duggan, P. J.; Ecroyd, H.; Liu, Y.; Meyer, A. G.; Tranberg, C. E., Carboxymethylated- κ -casein: A convenient tool for the identification of polyphenolic inhibitors of amyloid fibril formation. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2010**, *18* (1), 222-228.
123. Byrne, H.; Conroy, P. J.; Whisstock, J. C.; O'Kennedy, R. J., A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications. *Trends Biotechnol* **2013**, *31* (11), 621-32.
124. Yumura, K.; Akiba, H.; Nagatoishi, S.; Kusano-Arai, O.; Iwanari, H.; Hamakubo, T.; Tsumoto, K., Use of SpyTag/SpyCatcher to construct bispecific antibodies that target two epitopes of a single antigen. *J Biochem* **2017**, *162*(3), 203-210.

謝辞

様々な生理機能を有するカテキン類がなぜそのような様々な活性を持つのか、そこには他分子への非特異性の中の特異性をもった相互作用が存在するのではないかと。そして、その相互作用を理解すれば、自由に制御できる。この仮説をモチベーションに研究員時代を含め4年間研究を行ってきた。研究を始めるまで、分子間の相互作用の強弱に関する定量的な感覚を正直持ち得ておらず、そのせいで見たい現象が見えないような実験条件で行っていたように感じ、研究者としての感覚を根本的に良い意味で覆す経験をする事ができたと感じている。

このような貴重な経験を得ることが出来たのも、津本浩平教授と出会えたこと、その一言に尽きると思います。物理化学、熱力学をさけて研究生活をしてきた人生から、この分野を知らずして相互作用を語るべきではないとも思わせていただきました。また、ディスカッションの際には常に前向きなご意見をいただき、私以上に研究結果の面白さを語る姿には、毎回「次回のディスカッションの時にはもっと面白い、わくわくするような研究結果を出そう」と思わせていただきました。感謝の一言では言い表せないほどの経験をさせていただきました。本当にありがとうございました。これで終わりではなく、ここから始まりのつもりで、この経験を糧に食品化学の研究者のみにとどまらずケミカルバイオロジストとして精進していきたいと思っております。今後ともご指導、ご助言のほどよろしくお願いいたします。

また、学位審査の副査を務めてくださった、山東信介教授、河原正浩准教授、長門石暁准教授、野中洋講師。学位審査過程におけるご助言によって、新たな視点で研究を進めることが出来ました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

そして、研究の進め方、研究結果、社会人としてなど真面目な雑談を通して研究を推進していただいた長門石さん（ここではあえて長門石特任准教授ではなく、親しみを込めて長門石さんと呼ばせていただきます）。日々学生のご指導等でお忙しい中、長時間のディスカッションの中で生まれるアイデアに常に救われていました。約4年前、ITCを教えていただいた際の、EDTAとCaCl₂の相互作用に伴う発熱が随時出ていく様が今でも忘れられません。本当にありがとうございました。おこがましいですが、同じ世代で生きるものとして切磋琢磨してこの分野の研究を産学で盛り上げていければと思っております。

そして、計算化学という全く未知の領域に対して大きな興味、希望を持たせていただいた黒田さん（最大限の信頼を込めて黒田助教ではなく、黒田さんと呼ばせていただきます）。

4年前、お隣の席でまったくバックグラウンドが異なる2人から始まり、一緒に研究をさせていただくまでになれたことを大変うれしく思います。低分子しか扱ってこなかった合成化学の出身者として、蛋白質を巨大な分子としてしか意識していませんでしたが、1次構造、2次構造、3次構造、4次構造という複雑な構造体であるという意識を持たせていただきました。この視点を大事に、計算化学という技術をさらに自分のものにしたいと思いました。今後は研究のパートナーとしてだけでなく、計算化学をより学ばせていただければと思います。これからもよろしくお願いいたします。

また、NMRを用いたHSA-カテキン間の分子認識研究に関して、ご指導、ご協力いただきました、ブルカー・ジャパン(株)の金場様に深く感謝いたします。

最後に、私のわがままで学位取得に至るまでの時間を支えてくれた妻、こころに誰よりも感謝いたします。何度も夜中、朝方まで共に戦ってくれたこと、内容が理解できずとも話を聞いてくれたこと、常にポジティブに研究を進められた要因になりました。これからもご迷惑をおかけすると思いますが、今後ともよろしくお願いいたします。また、学位取得中に生まれた最愛の娘。なかなか遊んであげられずにごめんね。研究の合間に見られる愛らしい顔が私の力の源でした。

結びに、本研究に関して多大なご尽力をいただきました、研究室のスタッフの皆様、学生の皆様、関係者の皆様に感謝いたします。