

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏 名 高橋 知也

第1章 序論

「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る。一方で、医薬品成分と食品中の機能性成分との生理機能の強さは大きく異なり、それは、食品中の機能性成分の低吸収性および低い標的分子への特異性に由来すると考えられる。つまり食品中の機能性成分が持つ化学的特性を理解することで、生体内の蛋白質などの標的分子との相互作用を理解することができ、それらが示す生理機能の理解につながると考える。

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、様々な食品に含まれていることが知られている。食品素材の中でも Green tea（緑茶）が最もポリフェノール含量が多いことが知られている。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)、Epicatechin (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。これらの茶カテキンは、様々な蛋白質への作用によって生理効果を示すことが知られている。その一方で、蛋白質-茶カテキン間の物理化学的な相互作用解析に関する

る報告例はほとんどない。

物理化学的な相互作用解析は、生命科学分野で盛んに用いられている手法である。生理機能を有する蛋白質と医薬品との結合特性を精密に知ることができ、合理的なアプローチによる高活性な医薬品開発が可能になるとして注目されている。したがって、食品の機能性成分である茶カテキンと蛋白質間の相互作用を物理化学的に解析することで、茶カテキンの生理機能を理解し、制御することが可能であると考えられる。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。

本論文は全5章より構成されている。第1章の序論に続いて、第2章では特定の蛋白質としてヒト血清アルブミンを標的とした際に、茶カテキンが熱力学的にどのような結合を行うのかを熱力学解析、構造解析を駆使し検証を行っている。ここでは、ヒト血清アルブミンを認識するうえでカテキンの化学構造中のガロイル基が結合親和性獲得に寄与していることが明らかとした。第3章では、第2章で明らかとした他分子への結合親和性獲得に重要なガロイル基を有するカテキンにおいて、「熱力学的に好む相互作用相手が存在するのではないか」との仮説を検証している。ここでは、ガロイル基を有するカテキン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、蛋白質の局所構造を認識し親和性を獲得していることを見出した。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。ここでは、化学構造に依存した親和性の獲得機構が存在することを明らかとした。最後の第5章が総括、および今後の展望となる。

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。

第5章 総括

本研究で、カテキン1分子が有する各々の官能基は他分子認識における特異性を生み出すことを明らかとした。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。