

# 機能性食品成分の分子標的の同定とその作用機構に関する研究

立花宏文 (九州大学大学院 農学研究院)

tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp

食品成分の免疫調節作用として、アレルギーの発症因子であるアレルゲン特異的 IgE 産生およびその受容体の発現を抑制する食品成分を発見するとともに、その作用機構を解明した。また、カフェインによる抗体多様性調節作用を発見し、その標的分子を明らかにした。さらに、多彩な生理作用で注目されている緑茶カテキンと結合し、その生理作用を仲介する細胞膜上の標的分子（緑茶カテキン受容体）を同定した。

## はじめに

生活習慣に起因するとされる高血圧、肥満、糖尿病、アレルギー疾患の著しい増大から、ライフスタイルの改善による健康の自己管理が求められている。この自己管理の有力な手段として健康志向型食品（機能性食品もしくは特定保健用食品）の摂取が広く受け入れられつつある。こうした社会的背景のもと、我々は機能性食品創製の基となる食品成分（特に免疫機能調節成分）を探索するとともに、それら成分の標的分子を同定し、その作用機構を解明することで、食品の機能性に関する科学的基盤の確立を目指している。

## 食品成分の抗アレルギー作用

我々のからだは、免疫反応により体外異物の攻撃から守られているが、時として免疫反応はからだに対して傷害的に作用する。このような免疫機能に基づく傷害反応はアレルギーと呼ばれるが、近年、アレルギー患者数の増加および症状の重篤化が著しい。アレルゲンが生体内に侵入すると、アレルゲン特異的抗体の産生が誘導されるが、I 型アレルギーの発症には、特に IgE 型抗体が重要な役割を果たす。B 細胞により産生された IgE は、マスト細胞や好塩基球の細胞膜上に存在する高親和性 IgE 受容体に結合する。そこに、アレルゲンが再び侵入して細胞上の IgE を架橋すると、ヒスタミン等のメディエーターが放出され、アレルギーの発症に至る。

食品中には、食物アレルギーの原因となる成分が存在する一方、不快なアレルギー反応に対して予防・緩和作用を示す食品成分も存在することが明らかにされており、そうした成分を活用した抗アレルギー食品の開発が注目されている。そこで我々は、アレルギー発症に関与する主要な反応である 1) 炎症物質ヒスタミンの放出、2) 高親和性 IgE 受容体 FcεRI の発現、3) IgE 型抗体の産生、の三つの過程を抗アレルギー作用のターゲットとして選択し、食品の抗アレルギー性を評価するとともに、その機能性を担う食品成分を探索した。特に、日本人の日常生活に深く浸透した食履歴の長い嗜好飲料であり、古くから薬効を期待した使用もなされてきた茶 (*Camellia sinensis*) を中心に抗アレルギー成分の探索を行った。

### 1) 炎症物質ヒスタミンの放出阻害成分

アレルギーは、ヒスタミンやロイコトリエン等のケミカルメディエーターが放出されることで、炎症が惹起されることから、ケミカルメディエーターの産生・放出阻害活性は重要な抗アレルギー活性の指標である。国内で最も生産されている“やぶきた”ではなく、紅茶系品種である“べにほまれ”に、強い抗アレルギー作用があることが明らかにされていることから、ヒト好塩基球様細胞株を用い<sup>1)</sup>、細胞からのヒスタミン放出抑制活性を指標として“べにほまれ”より放出抑制成分の検索を行った。べにほまれ抽出物を分画して得られた画分の一つに強いヒスタミン放出抑制活性が認められ、その活性成分は緑茶に最も多く含まれるカテキンの一種である epigallocatechin 3-O-gallate (EGCG) のガロイル基がメチルエーテル化された epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3<sup>Me</sup>)

であることを明らかにした<sup>2)</sup>。この二つのカテキンに関してはマウスへの経口投与実験によって、I型およびIV型アレルギーに対する抑制作用が確認されている。また、このヒスタミン放出阻害作用には、多面的なプロテインキナーゼ阻害作用<sup>3)</sup>ならびにミオシン軽鎖リン酸化阻害作用<sup>4)</sup>が関与している。

## 2) 高親和性IgE受容体FcεRI発現を抑制する成分

花粉症や食物アレルギーなどのI型アレルギー反応では、好塩基球やマスト細胞表面上に存在する高親和性IgE受容体FcεRIがアレルゲン-IgE複合体によって架橋されることが、一連のアレルギー反応を誘導する引き金となる。FcεRIの凝集を介した好塩基球やマスト細胞の活性化が、I型アレルギーの発症に必須であることは、α鎖の遺伝子をノックアウトしたマウスでIgE依存的な炎症反応が惹起されないことから明らかであり、細胞表面上のFcεRI発現を抑制することは、IgEを介したアレルギー反応の予防・低減化につながる。そこで、好塩基球様細胞株を用いて茶成分のFcεRI発現抑制活性を検討した結果、EGCGおよびEGCG3<sup>7</sup>MeにFcεRIの発現抑制活性を見いだした<sup>5,6)</sup>。また、その抑制作用が、FcεRIの構成鎖であるαおよびγ鎖のmRNA発現量の低下であること、その発現低下作用にはPPARγリガンド活性<sup>7)</sup>やMAPキナーゼの一種であるERK1/2活性に対する阻害作用が関与していることを明らかにした<sup>8)</sup>。

## 3) IgE型抗体の産生抑制成分

I型アレルギーでは、特にIgE型の抗体が重要な役割を果たす。従って、IgEの産生を抑制する食品成分には抗アレルギー作用が期待できる。IgEは、抗体産生細胞であるB細胞がゲノムDNA上で抗体重鎖遺伝子の組み換え(クラススイッチ)を起こすことにより産生される。IgEへのクラススイッチは、サイトカインIL-4の刺激によるIgE重鎖胚転写(Cε germline transcripts; εGT)の発現が必須であり、εGT発現を阻害することはIgE産生の抑制につながる。そこで、このεGT発現に対する効果を指標に茶成分の抗アレルギー性を検討した。IL-4の刺激によりεGTを発現するヒト成熟B細胞株DND39を用いて、種々の溶媒を用いて得られた茶葉抽出画分のεGT発現に対する効果を検討した。その結果、阻害活性の強い画分中の活性成分がストリクチニンであることを明らかにした<sup>9)</sup>。また、ストリクチニンは、健康人ならびにアトピー患者由来の末梢血単核細胞におけるεGT発現も抑制した。εGT発現は、IL-4によって活性化(リン酸化)された転写因子STAT6により誘導されるが、ストリクチニンはこのリン酸化を阻害する<sup>9)</sup>。

## 食品成分による抗体の多様性形成調節作用

コーヒーや茶といった嗜好食品に多く含まれるカフェインは、自律神経活性化作用や抗腫瘍作用を有することが知られているが、新たな生理作用として、抗体の可変領域における多様性形成を調節する作用を発見した<sup>10,11)</sup>。さらに、このカフェインによる作用が抗体遺伝子領域におけるDNA切断誘導によること、その誘導がpoly(ADP-ribose) polymeraseの阻害による、組み換え部位におけるヒストン特異的なアセチル化誘導に基づくことを明らかにした。

## 緑茶カテキン受容体の発見

緑茶カテキンの生理作用として、抗酸化作用、抗ガン作用、抗アレルギー作用、血圧上昇抑制作用、動脈硬化抑制作用、脂質代謝改善作用などが報告されており、茶による生活習慣病の予防効果に期待が寄せられている。緑茶葉には乾燥重量で約10~20%のカテキン類が含まれているが、その約半量を占めるのがEGCGであり、他のカテキン類と比較して強い生理活性を有していることが明らかとなっている。

カテキン類の保健作用はこれまで、その高い抗酸化活性と関連させたものがほとんどであった。これに対して、ガン細胞の増殖抑制効果がカテキンの種類によって著しく異なること、また、抑制効果のあるEGCGはガン細胞の表面に結合するが、抑制効果のないカテキンには結合性がないことを見出してきた。こうした結果から、緑茶カテキンを受け取ってその生理作用を仲介する分子(緑茶カテキン受容体)が細胞表面上に存在するのではない

かと想定し、この分子の同定を試みた。その結果、細胞表面におけるシグナル伝達分子の機能発現の場である細胞膜マイクロドメインラフトに、EGCGが局在することを見いだした<sup>8)</sup>。一方、all-trans-retinoic acid (ATRA)が、乳ガン細胞株の細胞表面におけるEGCGの結合性およびその増殖抑制活性を増大させることを見出した。そこで、ATRA処理を行った細胞ではEGCGの結合に関与する遺伝子の発現が増大すると仮定し、サブトラクションクローニング法を用いてその遺伝子のクローニングを行った。その結果、細胞膜ラフトに局在する67kDaラミニンレセプター(67LR)を見いだした<sup>12)</sup>。

67LRは、基底膜固有の細胞外マトリックスの一種であるラミニンに結合する細胞膜タンパク質で、悪性度の高いガン細胞に高発現し、その浸潤、転移などに関与することが知られている。また最近では、病原性プリオンタンパク質の増殖に関与していることが明らかにされた分子でもある。ヒト肺ガン細胞株に67LR遺伝子を導入すると、細胞表面上における67LRの発現量が増大するとともに、EGCGの細胞表面への結合性並びに細胞増殖抑制作用が著しく増大した<sup>12)</sup>。

一方、RNA干渉法を用いて67LRの発現を特異的に低下させると、EGCGの細胞表面結合性とその細胞増殖抑制活性がともに著しく低下した。EGCGと67LRタンパク質との直接的な結合力を表面プラズモン共鳴センサーにて解析したところ、Kd値は約40 nMであった<sup>12)</sup>。

これまで、EGCGの抗ガン作用に関する研究の多くは20~100 μMという濃度で行われてきた。しかしながら、我々が数杯のお茶を摂取しても、EGCGの血中濃度は約1 μM程度にすぎない。この生理的濃度である1 μMのEGCGに感受性を示さないガン細胞株も、67LRを発現させることによって、EGCGの結合性が顕著に増大するとともにその増殖が抑制された。一方、67LRに対する抗体で、その細胞表面に発現している67LRを塞ぐと、EGCGの細胞表面への結合が低下するとともに、その細胞増殖抑制作用も阻害された<sup>12)</sup>。

緑茶には、カテキン以外にもカフェインなどの生理活性物質が多く含まれているが、EGCG以外の茶成分では67LRの発現に関わらず細胞表面における結合性は認められなかった<sup>12)</sup>。また、EGCGにおいて観察されたような顕著な細胞の増殖抑制効果も示されなかった。これらの結果から、67LRは生理的な濃度におけるEGCGと細胞表面において結合し、その生理作用を仲介する受容体として機能することが明らかとなった。食品成分受容体の同定はこれまでのところ、辛味成分カプサイシンやカラシ油成分アリルイソチオシアネートなどが明らかにされているにすぎず、機能性食品成分の標的分子に関する研究が加速されることが望まれる。

#### おわりに

最近、食品科学の新たなパラダイムとして、1)各々の機能性食品成分の効き方を決定する遺伝的背景の解明(ニュートリゲノミクス)、2)機能性食品成分の作用効率を他の食品によって高めるための食品設計(食べ合わせの科学)、3)各人の体質に適応した機能性食品の創製(テーラーメイド食品)、などが注目されているが、食品成分の機能性に関与する標的分子に関する研究が、こうした分野を支える科学的基盤として役立つことを期待したい。また、緑茶カテキン受容体に関する成果は、カテキンの多彩な生理機能を模倣した分子標的創薬へも展開させていきたいと考えている。

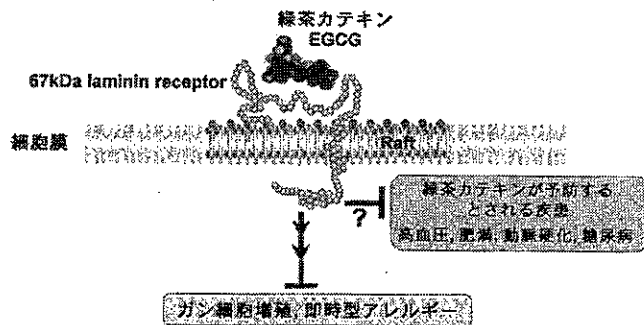


図1 緑茶カテキン受容体としての67kDa laminin receptor

## 謝辞

本研究は、九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食糧化学研究室で行われたものです。本成果は学生諸氏の努力の賜であり、深く感謝申し上げます。研究を遂行するに当たり、終始ご指導ご高配いただきました九州大学山田耕路教授をはじめ諸先生方に厚くお礼申し上げます。また、研究にご協力ご助言をいただいている野菜茶業研究所山本万里博士、静岡県立大宮瀬敏男先生、名古屋女子大佐野満昭先生、三菱ウエルファーマ下村猛博士に心からお礼申し上げます。本賞に推薦くださいました九州大学大学院農学研究院長、江頭和彦先生にお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Hara T., Yamada K. and Tachibana H. (1998) Basophilic differentiation of the human leukemia cell line KU812 upon treatment with interleukin-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:542-548.
- 2) Tachibana H., Sunada Y., Miyase T., Sano M., Maeda-Yamamoto M. and Yamada K. (2000) Identification of a methylated epigallocatechin gallate as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64:452-454.
- 3) Maeda-Yamamoto M., Inagaki N., Kitaura J., Chikumoto T., Kawahara H., Kawakami Y., Sano M., Miyase T., Tachibana H., Nagai H., and Kawakami T. (2004) *O*-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunol.* 172:4486-4492.
- 4) 立花宏文 (2004) 茶成分の免疫調節作用-食品成分のはたらき-、朝倉書店、東京、121pp.
- 5) Fujimura Y., Tachibana H. and Yamada K. (2001) A tea catechin suppresses the expression of the high affinity IgE receptor FcεRI in the human basophilic KU812 cells. *J. Agric. Food Chem.* 49:2527-2531.
- 6) Fujimura Y., Tachibana H., Maeda-Yamamoto M., Miyase T., Sano M. and Yamada K. (2002) Antiallergic tea catechin, (-)-Epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate, suppresses FcεRI expression in human basophilic KU812 cells. *J. Agric. Food Chem.* 50:5729-5734.
- 7) Fujimura Y., Tachibana H. and Yamada K. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligands negatively regulate the expression of the high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic KU812 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:193-201.
- 8) Fujimura Y., Tachibana H. and Yamada K. (2004) Lipid raft-associated catechin suppresses the FcεRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2. *FEBS Lett.* 556:204-210.
- 9) Tachibana H., Kubo T., Miyase T., Tanino S., Yoshimoto M., Sano M., Yamamoto-Maeda M. and Yamada K. (2001) Identification of an inhibitor for interleukin 4-induced ε germline transcription and antigen-specific IgE production in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280:53-60.
- 10) Tachibana H., Haruta H. and Yamada K. (1999) Light Chain Shifting: Identification of a human plasma cell line actively undergoing light chain replacement. *Blood* 93:198-207.
- 11) Tachibana H., Haruta H., Ueda K., Chiwata T. and Yamada K. (2000) Induction of light chain replacement in human plasma cells by caffeine independent from enhancement of RAG proteins expression and germ-line transcription. *J. Biol. Chem.* 275:5927-5933.
- 12) Tachibana H., Koga K., Fujimura Y. and Yamada K. (2004) A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Struct. Mol. Biol.* 11:380-381.

## Identification and Characterization of Molecular Targets of Functional Food Components

Hirofumi Tachibana (Kyushu University, Faculty of Agriculture)

tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp