



緑茶カテキンの受容体とシグナリング

1. はじめに

茶 (*Camellia sinensis*) は、抗がん作用、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、抗ウイルス作用などの多彩な生理作用が報告されるとともに、カテキン類を中心とする茶葉成分に関する研究が盛んである。茶カテキンの中でも(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (図 1A) は他のカテキンと比較して強い生理活性を示すことから、その作用は特に注目されている。EGCG の作用機序を理解する上で、EGCG が生体内で直接相互作用する分子を知ることは重要であり、これまでに EGCG と結合する分子として、種々の細胞内タンパク質が報告されている^{1,2)}。しかしながら多くの場合、生理的濃度 (ヒトにおける最大血中濃度は $1\ \mu\text{M}$ 程度)³⁾ から大きくかけ離れた量 ($10\sim 100\ \mu\text{M}$) の EGCG を用いて得られた結果である。筆者らはこの点をふまえ、生理的濃度の EGCG の活性発現に関与する真の標的分子の探索を試みた。ここでは、EGCG のがん細胞増殖抑制作用を仲介する細胞膜受容体 (緑茶カテキン受容体) として発見した $67\ \text{kDa}$ ラミニンレセプター (67LR) を介した EGCG の生理活性とその伝達機構 (緑茶カテキンシグナリング) について述べる。

2. 緑茶カテキン受容体としての $67\ \text{kDa}$ ラミニンレセプターの発見

カテキン類のがん細胞増殖抑制作用はよく知られた生理活性の一つであるが、その活性の有無や強弱には明確な違いがある。筆者らは、カテキン類の構造とその抗がん作用の関係を探る過程で、活性の強い EGCG が細胞の表面に結合するのに対し、活性の弱いカテキンは結合しないこと

を見いだした。そこで、EGCG と特異的に結合し、その抗がん作用を担う受容体が細胞膜上に存在するのではないかとこのコンセプトのもと、細胞表面上における EGCG の標的分子の探索を試みた。

まず、all-*trans*-retinoic acid (ATRA) が乳がん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強させることを見いだした。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、その遺伝子のクローニングを行った。その結果、 $67\ \text{kDa}$ ラミニンレセプター (67LR) を見いだした⁴⁾。67LR は基底膜の主要な構成成分であるラミニンに結合する細胞膜タンパク質として同定されていた分子であり、悪性度の高いがん細胞に高発現し、その増殖、浸潤、転移などに関与することが知られている⁵⁾。この他にも病原性プリオンタンパク質の受容体としての機能や sindbis virus, adeno-associated virus, dengue virus といったウイルスの受容体として機能することが報告されている。

$5\ \mu\text{M}$ の EGCG に応答しないがん細胞株に 67LR を過剰発現させたところ、 $0.1\ \mu\text{M}$ の EGCG によってもその細胞増殖が顕著に抑えられた。一方、67LR に対する抗体で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⁴⁾。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含まれているが、試験に供した EGCG 以外の茶成分はいずれも、67LR の発現増強に関わらず細胞表面への結合は認められず、細胞の増殖抑制作用も発現しなかった⁴⁾ (図 1B)。さらに、マウスメラノーマ細胞株 B16 を用いたマウス腫瘍モデル実験において、EGCG の経口摂取による腫瘍成長抑制作用が、67LR の発現を RNA 干渉法により抑制した B16 細胞では全く観察されなかった⁶⁾ (図 2)。以上の結果から、67LR は生体内における EGCG の抗がん作用を仲介する受容体であることが明らかになった。

67LR 分子における EGCG の結合部位は 161-170 番目のアミノ酸残基からなるドメインであることが、67LR の細胞外ドメイン由来のペプチドや結合ドメイン欠損体を用いた検討より示された。この EGCG 結合配列は、ラミニンの結合部位 173-178 と隣接するとともに、プリオンの結合部位 161-179 と重複しており、EGCG の多彩な生理作用を考える上で興味深い。

3. 緑茶カテキン受容体を介した抗がん作用

EGCG はヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa に対しストレ

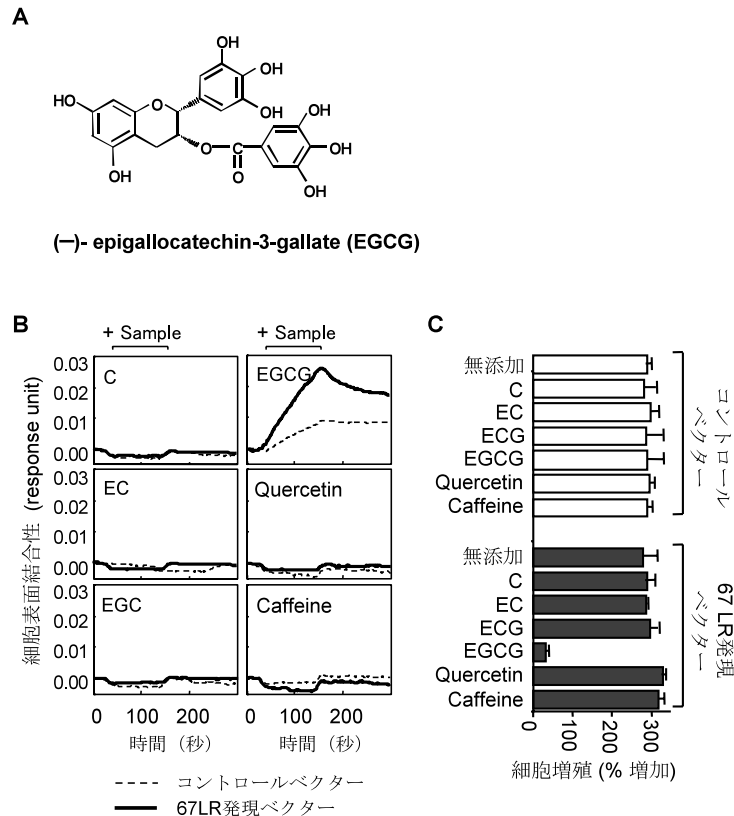


図1 茶葉成分の細胞表面結合性および細胞増殖抑制作用に対する67LR 過剰発現の影響

- A. 緑茶カテキン EGCG の構造
- B. 67LR 発現ベクターを導入し、67LR 発現を増強した肺がん細胞株 A549 の細胞表面に対する緑茶成分の結合性を表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて測定 (C：(-)-catechin, EC：(-)-epicatechin, EGC：(-)-epigallocatechin)
- C. 67LR 発現ベクターを導入し、67LR 発現を増強した A549 の細胞増殖に対する緑茶成分の影響を測定.

スファイバーを消失させるとともに、ストレスファイバーの形成に重要なミオシン軽鎖のリン酸化レベルを低下させた。また、細胞分裂期に形成されるミオシン軽鎖依存性の収縮環の形成も阻害した⁷⁾。これらの結果より、EGCG はミオシン軽鎖のリン酸化レベルを低下させることでストレスファイバーの形成や細胞分裂時の収縮環形成を阻害し、細胞周期を遅延させることが示唆された。こうしたEGCG の作用における67LR の関与を検討するため、67LR の発現をRNA 干渉法により抑制したところ、細胞増殖抑制作用およびミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作用はともに阻害された^{7,8)}。以上の結果から、67LR を介したミオシン軽鎖のリン酸化レベルの低下作用がもたらすストレスファイバーの消失や収縮環形成阻害が、EGCG の細胞増殖抑制

作用の一因であることが示された。

一方、がん細胞致死作用もEGCG のよく知られた生理活性の一つである。ハーバード大学のグループは最近、多発性骨髄腫患者由来の骨髄腫細胞に対しEGCG がアポトーシスを誘導すること、また、多発性骨髄腫細胞には67LR が高発現し、アポトーシス誘導作用が67LR を介していることを明らかにした⁹⁾。

4. 緑茶カテキン受容体を介した抗アレルギー作用

花粉症に代表されるI型アレルギーでは、アレルギー特異的IgE が中心的役割を担っており、これがマスト細胞や好塩基球の細胞膜上に発現している高親和性IgE 受容体FcεRI に結合する。そこに、アレルギーが再び侵入してこ

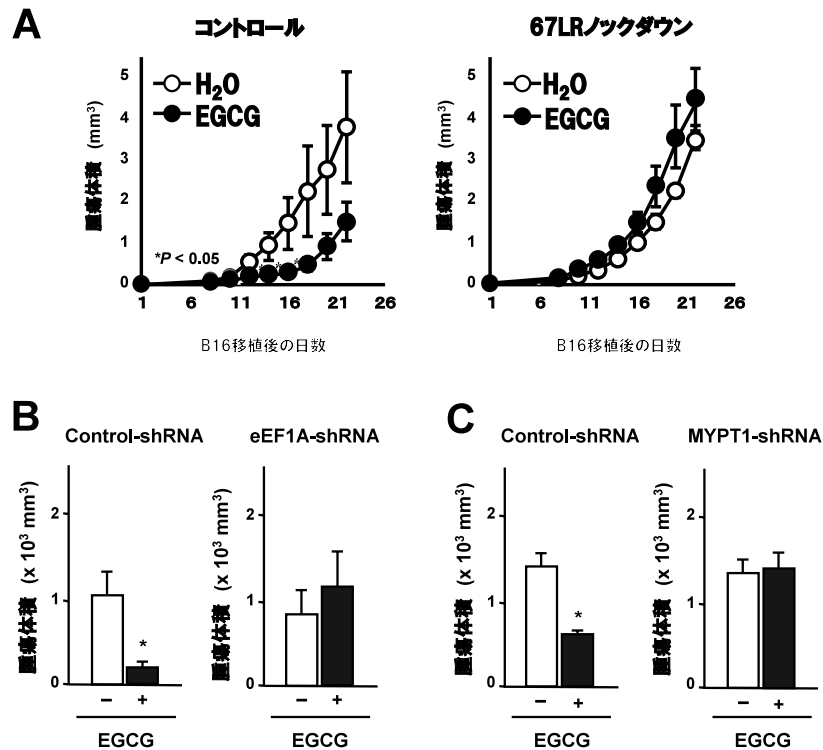


図2 EGCGの抗腫瘍作用における緑茶カテキンシグナリングを担う分子の重要性 67LR(A), eEF1A(B), MYPT1(C)の各発現をRNA干渉法によりノックダウンしたマウスメラノーマ細胞株B16を移植したマウスにEGCG(0.1%)を経口投与し、腫瘍成長に対する影響を評価。

れら細胞上のIgEを架橋すると、ヒスタミンなどの放出(脱顆粒)が誘導されることでアレルギーの発症に至る。

筆者らは、ヒト好塩基球細胞株においてEGCGがヒスタミン放出阻害作用を示すとともに、ミオシン軽鎖のリン酸化を低下させることを見いだした¹⁰⁾。ミオシン軽鎖のリン酸化レベルは細胞の脱顆粒強度と相関を示し、ミオシン軽鎖のリン酸化を阻害すると脱顆粒が抑制される。そこで、EGCGのヒスタミン放出阻害作用およびミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作用における67LRの関与をRNA干渉法により検討したところ、67LRをノックダウンしたヒト好塩基球細胞株では、EGCGのヒスタミン放出抑制作用ならびにミオシン軽鎖リン酸化レベルの低下作用のいずれもが阻害された¹⁰⁾。さらに、EGCGは脱顆粒過程において生じる細胞膜ラフリングを攪乱するが、この攪乱作用も67LRのノックダウンにより阻害された。以上の結果より、EGCGは67LRを介してミオシン軽鎖のリン酸化を阻害し、ヒスタミン放出を阻害することが示された。

(-)epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)gallate (メチル化

カテキン)は抗アレルギー作用を示す茶葉中から発見された成分であり^{11,12)}、日本緑茶の代表的な品種である“やぶきた”には全く含まれない成分である。メチル化カテキンを豊富に含む“べにふうき緑茶”の花粉症患者に対する試験では有意な症状の緩和効果が示されている。筆者らはこれまでに、メチル化カテキンもEGCGと同様に、ヒスタミン放出を阻害することを明らかにしている^{12,13)}。そこでこうしたメチル化カテキンの作用における67LRの関与を検討した結果、67LR発現のノックダウンにより、細胞表面結合性およびヒスタミン放出阻害作用のいずれもが抑制され、EGCGと同様、メチル化カテキンの抗アレルギー作用に67LRが関与していることが示された¹⁴⁾。

5. 緑茶カテキンの機能性発現を担う分子 —緑茶カテキン感受性遺伝子

これまで述べてきたように、67LRは緑茶カテキンEGCGを受け取り、EGCGのがん細胞増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用、抗アレルギー作用等の生理作用を仲介

する細胞表面受容体分子として機能する。そこで次に、EGCGが67LRに結合した後、どのようにその作用が伝達されるのか、67LRを介したEGCGのシグナル伝達に関与する細胞内因子の同定をフォワードジェネティクス的手法により試みた。その結果、eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A)をEGCGの細胞増殖抑制作用に不可欠な遺伝子として見いだした⁶⁾。eEF1Aを過剰発現させたところ、EGCGのがん細胞増殖抑制作用およびミオシン軽鎖のリン酸化レベル低下作用が亢進した。一方、これらEGCGの作用はRNA干渉法によるeEF1A発現抑制により消失した。さらに、B16細胞を用いたマウス腫瘍モデルにおいて、コントロールB16細胞を移植したマウスではEGCG経口投与により腫瘍の成長が阻害されたが、eEF1Aの発現を抑制したB16細胞の腫瘍成長は全く阻害されなかった⁶⁾(図2)。これらの結果より、eEF1AはEGCGの細胞増殖抑制作用を伝達する細胞内分子であることが示された。

EGCGによる細胞増殖抑制作用ならびにヒスタミン放出阻害作用にミオシン軽鎖のリン酸化レベルの低下が関与していることを示してきたが、そのリン酸化状態はミオシン軽鎖を基質とするキナーゼホスファターゼの両酵素により調節されている。そこで、ミオシンホスファターゼの活性調節サブユニットMYPT1の関与について検討した結果、EGCGはミオシンホスファターゼ活性を負に調節するMYPT1のThr696におけるリン酸化レベルを低下させること、また、MYPT1の発現抑制により、EGCGによる細胞増殖抑制作用やヒスタミン放出阻害作用が損なわれることを見いだした^{6,10)}。さらに、EGCG経口投与によるB16細胞の腫瘍成長抑制作用もMYPT1の発現抑制により阻害された⁶⁾(図2)。これらの結果より、eEF1AおよびMYPT1がEGCGの細胞増殖抑制作用を伝達する細胞内分子(緑茶カテキン感受性遺伝子)であることが示され、67LRからMYPT1の活性化につながるシグナル伝達経路の存在が明らかになった(図3)。

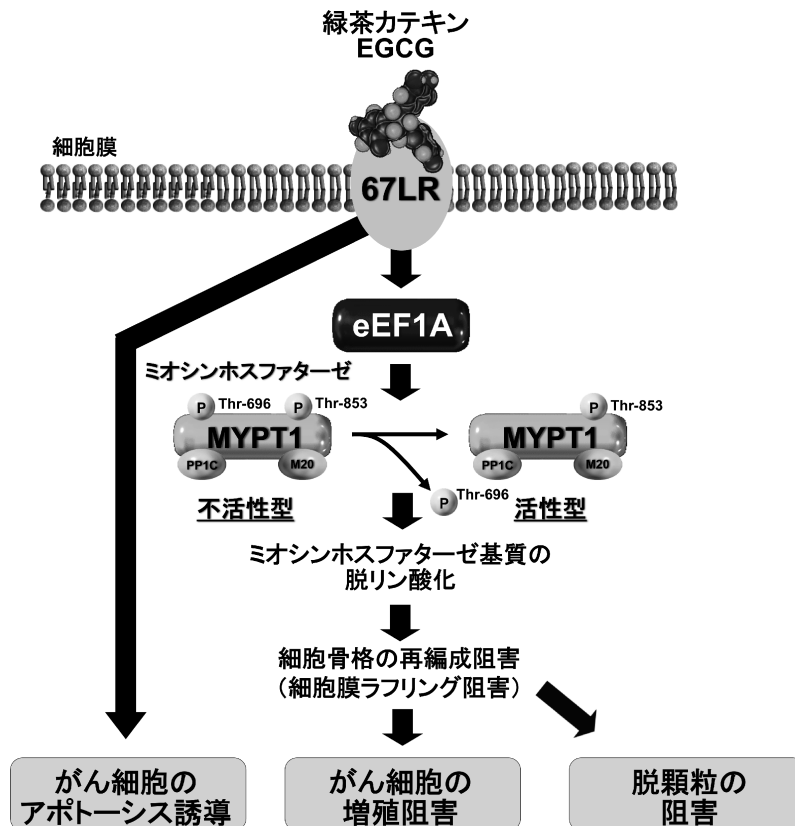


図3 緑茶カテキン受容体67LRを介したEGCGの機能性発現とシグナリングの概略

詳細は本文参照。

6. おわりに

最近の臨床研究では、EGCGを主な成分とする緑茶カテキンの経口投与による前立腺がんの予防作用が示されたが¹⁵⁾、疫学データには、緑茶飲用とがん予防作用との相関性に否定的な報告もある。今後、緑茶カテキン感受性遺伝子の解明が、緑茶カテキンの効き方の違い（例えば、EGCG感受性がんと耐性がん）の理解に繋がり、緑茶カテキンが機能性素材として、より安全で効果的に活用されることを期待したい。

本稿で紹介した筆者らの研究は、九州大学大学院農学研究大学院食糧化学研究室において行われました。本研究室のスタッフ、多くの学生さん、田辺三菱製薬下村猛博士ならびに野菜茶業研究所山本（前田）万里博士をはじめ研究を力強くサポートして頂いた皆様に深くお礼申し上げます。

- 1) Ermakova, S., Choi, B.Y., Choi, H.S., Kang, B.S., Bode, A.M., & Dong, Z. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 16882–16890.
- 2) Yang, C.S., Sang, S., Lambert, J.D., Hou, Z., Ju, J., & Lu, G. (2006) *Mol. Nutr. Food Res.*, **50**, 170–175.
- 3) Chow, H-H., Cai, Y., Hakim, I.A., Crowell, J.A., Shahi, F., Brooks, C.A., Dorr, R.T., Hara, Y., & Alberts, D.S. (2003) *Clin. Cancer Res.*, **9**, 3312–3319.
- 4) Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2004) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 380–381.
- 5) Menard, S., Castronovo, V., Tagliabue, E., & Sobel, M.E. (1997) *J. Cell. Biochem.*, **67**, 155–165.
- 6) Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 3050–3058.
- 7) Umeda, D., Tachibana, H., & Yamada, K. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 628–635.
- 8) Umeda, D., Yano, S., Yamada, K., & Tachibana, H. (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **371**, 172–176.
- 9) Shammas, M.A., Neri, P., Koley, H., Batchu, R.B., Bertheau, R.C., Munshi, V., Prabhala, R., Fulciniti, M., Tai, Y.T., Treon, S.P., Goyal, R.K., Anderson, K.C., & Munshi, N.C. (2006) *Blood*, **108**, 2804–2810.
- 10) Fujimura, Y., Yamada, K., & Tachibana, H. (2006) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **348**, 524–531.
- 11) Sano, M., Suzuki, M., Miyase, K., Yoshino, K., & Maeda-Yamamoto, M. (1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906–1910.
- 12) Tachibana, H., Sunada, Y., Miyase, T., Sano, M., Maeda-Yamamoto, M., & Yamada, K. (2000) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 452–454.
- 13) Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikumoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H., & Kawakami, T. (2004) *J. Immunol.*, **172**, 4486–4492.
- 14) Fujimura, Y., Umeda, D., Yano, S., Maeda-Yamamoto, M., Yamada, K., & Tachibana, H. (2007) *Biochem. Biophys. Res.*

Commun., **364**, 79–85.

- 15) Bettuzzi, S., Brausi, M., Rizzi, F., Castagnetti, G., Peracchia, G., & Corti, A. (2006) *Cancer Res.*, **66**, 1234–1240.

立花 宏文

(九州大学大学院農学研究大学院生物機能科学部門
食糧化学分野)

Green tea polyphenol receptor and the signaling pathway
Hirofumi Tachibana (Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Higashi-ku, Hakozaki 6-10-1, Fukuoka 812-8581, Japan)

アミノアシル tRNA タンパク質転移酵素の 基質認識、反応触媒の分子機構の解明

1. はじめに

生体における特定のタンパク質の空間的-時間的分解は、翻訳後の遺伝子発現に重要な役割を担っている。原核生物、真核生物に共通してタンパク質の分解のしやすさはタンパク質のアミノ末端残基によって支配されている（Nエンド則）。Nエンド則は染色体の分離、細胞死、一酸化窒素の探知などに関与するタンパク質の分解に関与していることが知られており、高次生命現象の制御に関わっている¹⁻⁸⁾。原核生物、真核生物ともにNエンド則によるタンパク質分解経路に至る初期段階で、タンパク質のアミノ末端に不安定化アミノ酸を付加するアミノアシル tRNA タンパク質転移酵素が関与している。この酵素は特定のアミノアシル tRNA を認識し、tRNA の 3'末端に付加されたアミノ酸を、特定のアミノ酸をアミノ末端に有するタンパク質のアミノ末端へ転移する酵素である。不安定化アミノ酸がアミノ末端へ付加されたタンパク質はタンパク質分解複合体によって分解を受ける。これまでに真核生物では Arg-tRNA^{Arg} を基質供与体として、N末端がアスパラギン酸/グルタミン酸残基であるタンパク質を受容体とするアルジニル tRNA 転移酵素、真正細菌では Leu-tRNA^{Leu}/Phe-tRNA^{Phe} を供与体として、N末端がリジン/アルギニン残基であるタンパク質を受容体とするロイシル/フェニアラニル tRNA 転移酵素（LF 転移酵素）が知られている。また、最近では、これらの酵素群に属するが、アミノ酸の供与基質、受容基質の特異性の異なるものが見いだされてきている⁹⁾。しかしながら、これらの酵素の基質認識、反