

# 茶カテキン類と生体成分との分子間相互作用

中山 勉

日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科農産食品学教室

**要約** 茶カテキン類の, (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECg), (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) について, リン脂質二重層やタンパク質との相互作用を, HPLCやQCMなどの方法を用いて解析した。その結果, リン脂質とタンパク質の両者に対して, ECgとEGCgなどのガレート型カテキン類がECやEGCなどの非ガレート型カテキン類よりも高い親和性を示すことが明らかになった。これにはガロイル基の存在による疎水結合が大きな役割を果たしていると考えられる。ECgやEGCgなどのガレート型カテキン類とリン脂質との相互作用に関して, 固体および溶液NMR法によりさらに詳しい解析を行った。その結果, これらのカテキン類はリン脂質膜を構成するホスファチジルコリンの $\gamma$ -メチル基の近傍に存在し, 疎水性相互作用を行っている可能性が示唆された。以上の相互作用はカテキン類の味質にも深く関連していることが明らかになった。

**キーワード**: カテキン類, リン脂質, 分子間相互作用

日獣生大研報 62, 1-7, 2013.

## 1. はじめに

食品の新しい機能が注目され, ヒトの健康に様々な影響を与えることが世界中の研究者によって立証されつつある。食品の機能性を, 1次(栄養), 2次(嗜好性), 3次(生理機能)に分類した場合, 特に3次機能による生活習慣病の予防あるいは低減効果が期待されている。ここで生理機能の強さや作用の特異性を考えると, [医薬品成分] > [食品の機能性成分] >> [その他の食品成分] という順序であることが多い。すなわち, 食品の機能性成分の作用は医薬品のそれに比べて弱く, これは吸収性の低さや作用の特異性の低さに由来すると考えられる。ある物質が生理作用を示す場合, その過程のどこかで, 脂質膜やタンパク質などの生体成分との分子間相互作用が関わることは必然であると考えられるが, 特異性が低い場合はその解析に困難が伴う。

茶 (*Camellia sinensis*) は中国が起源といわれ, 緑茶の飲用は日本に一種の“薬”として伝わった。茶の薬理作用としてはカフェインの効果が際立っているものの, 最近ではカテキン類に関する様々な機能が明らかになっている。どのようなカテキン類の機能においても, 生体成分との分子間相互作用が第一段階として考えられるが, その特異性は医薬品成分に比べて低い。そこで我々は, 茶ポリフェノールによるリン脂質やタンパク質などの生体成分との分子間相互作用を解析する方法を開発することから始め, カテキン類の脂質膜に対する親和性や, 脂質膜中での動態などを

解析し, その生理活性強度との関連を調べてきた。得られた結果は少なくともin vitro実験における構造活性相関をよく説明できる上に, 茶の味質とも深く関連していることが明らかになってきた。さらに, カテキン類が細胞膜上のどこに存在し, どのような動きをしているについてもイメージできるようになった。この総説においては, いままで我々が行ってきたこれらの化学的研究の成果を紹介したい。

## 2. 茶カテキン類とは

茶には多種類のポリフェノールが含まれているが, 特に(-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECg), (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) の4種類の濃度が高く, 多くの研究がなされている (Fig. 1)。ECとEGC, あるいはECgとEGCgはB環の水酸基の数が異なり, ECとECgの場合は2個, EGCとEGCgの場合は3個である。また, ECgとEC, EGCgとEGCの違いはC環に没食子酸が結合しているかないかの差である。ガレートとは没食子酸エステルのことであり, その部分構造はガロイル基と呼ばれている。4種類のカテキン類のうち, EGCgはほとんどの茶において含有量が最も高く, 生理活性もこの中では一番強いことが多い。我々は相互作用における構造活性相関を数値的に評価し, 4種類のカテキン類を比較することにより研究を進めた。

いまままでに4種類のカテキン類を用いたモデル実験やin vitro実験の報告は多数あるが, 経験的にガレートエステ

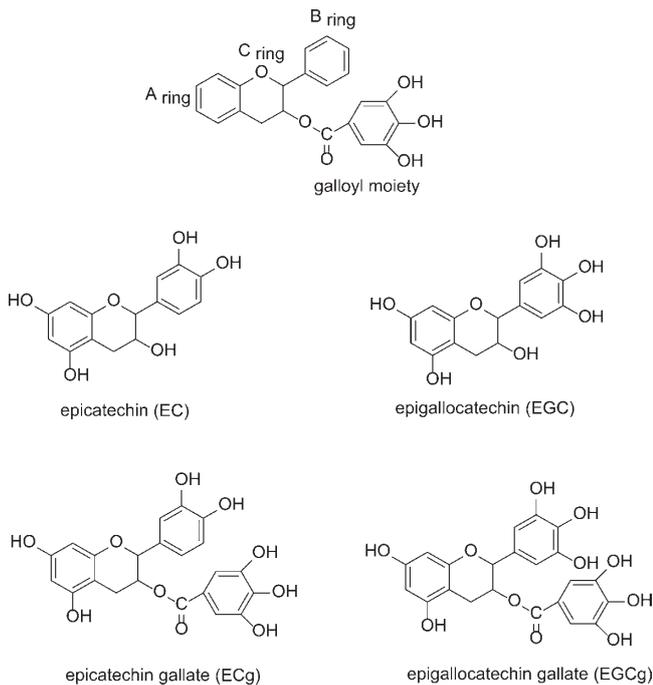


Fig. 1. Structures of tea catechins

ルであるECgやEGCgの活性（作用）が高いことが明らかになっていた<sup>1-4)</sup>。以前、ガレートエステルが高い活性を示す理由は水酸基を3つ持つガロイル基の抗酸化性にあるとされていたが、その後の研究により、その可能性は低いと考えられている。

茶飲料を経口摂取した時、そこに含まれるカテキン類が期待されている標的に到達するまでに、相互作用する食品成分と生体成分を考えてみることにする。

[茶飲料中の他の成分] カテキン類同志、カフェイン、ビタミンC、タンパク質、脂質等が考えられるが、これらの成分によって、カテキン類の生理活性が影響を受けたという報告はあまり見受けられない。ただし、“深蒸し茶”のようにかなりの濃度の固体成分が懸濁している飲料の場合は、そこに含まれている成分によるカテキン類の苦渋味抑制効果が十分に予想される。

[口内] 口の中における一番明確な“生理活性”は味覚であろう。いままで茶の苦味と渋味を分けて評価することは困難であった。しかし最近の研究により、苦味は舌細胞の表面に発現している味覚受容体で特異的に認識される一方、渋味は舌細胞の細胞膜（すなわちそこに存在するリン脂質あるいはタンパク質）あるいは唾液に含まれるタンパク質との非特異的な相互作用により、認識されると考えられている。

[食道、胃、十二指腸、小腸、大腸などの管腔内] ここでは茶以外の食品成分、消化酵素、腸内細菌、胆汁酸ミセル等、様々な成分と相互作用する。

[腸管上皮細胞] 茶カテキン類は経口摂取された後、わずかな割合で腸管から吸収されて血中に移行することが明らか

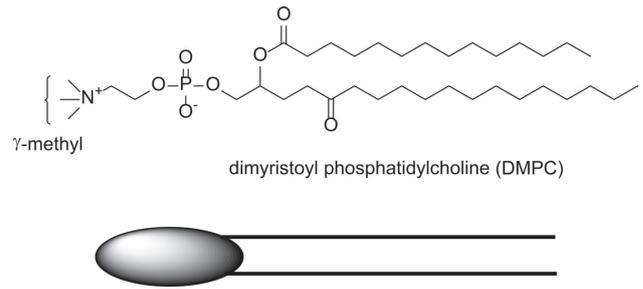


Fig. 2. Structure of dimyristoyl phosphatidylcholine and its simple model (below)

かになっている。したがって、腸管上皮細胞の細胞膜やそこに存在する様々な受容体、トランスポーター等のタンパク質とも相互作用する可能性が考えられる。

[血中] 血管内皮細胞、様々な血球、血清アルブミン、リポタンパク質等、ここでも様々な成分と相互作用する可能性がある。九州大学の立花らは、EGCgが細胞膜上に発現しているラミニンレセプター（67LR）と高い親和性を持って“特異的”に相互作用することを報告している<sup>5)</sup>。

### 3. 茶カテキン類とリン脂質との相互作用

これまでに述べたように、茶カテキン類は経口摂取された後、口内、管腔内、腸管上皮細胞、血中と様々な場所でさまざまな物質と相互作用する可能性がある。特に腸管上皮細胞に到達するまではカテキン濃度はかなり高く、in vitro実験の結果であっても、ヒトにおける作用の実態を反映していると考えられる。一般的にある物質が細胞に作用する場合は、それが特異的であるか非特異的であるかにかかわらず、ランダムな動きを繰り返した後、まず接触する確率の高い細胞膜に到達することが想像される。その後、細胞膜上（あるいは細胞膜中）をランダムに動いて、親和性の高い標的（例えば受容体）に到達するのではないかと。このような仮説に基づき、細胞膜の構成成分として量的に多いリン脂質への親和性を解析した。Fig. 2に典型的なリン脂質であるホスファチジルコリンの構造式とその模式図を示す。模式図において楕円の部分はリン酸基やコリンからなる親水領域、二つの直線部分はアルキル鎖を示す。

#### 3.1 リポソームを用いた解析

カテキン類の抗菌性、抗ウイルス活性、がん細胞増殖抑制効果、リポタンパク質に対する抗酸化活性などのいずれの場合もリン脂質への相互作用が大きく影響すると考えられる。そこでこれらに共通するリン脂質だけを構成成分とする脂質二重層のモデルとしてリポソームを用い、カテキン類のリン脂質膜に対する相互作用を解析した（Fig. 3において、脂質二重層とバイセルはリン脂質の集合体として描かれている。また、リポソームのリン脂質二重層は二重の円として表されている）。まず、一連の研究の出発点としてカテキン類のリポソームへの吸着量を調べた（研究当初は、カテキン類がリン脂質二重層のどこまで到達してい

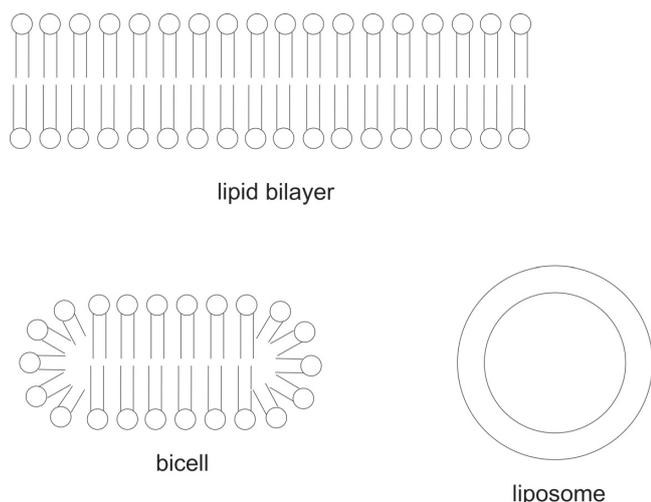


Fig. 3. models for phospholipid bilayers

るか不明であったので、「取り込み」という表現を使ったが、その後の研究で、カテキン類は二重層の極めて表面に吸着していることが判明した。そこで本総説においては「吸着」という言葉を用いることにする。4種類のカテキン類の中ではECg(70%)とEGCg(44%)の吸着量が高く、EC(10%)とEGC(0%)のそれをはるかに引き離していた(数字は同一条件下でリポソーム懸濁液にカテキン類を加えた時にリポソームに吸着した割合)<sup>6-8)</sup>。この結果は、ガロイル基の存在がリン脂質に対する親和性増大に重要であることを示している。例えば、ともに水溶性のエタノールと酢酸が脱水縮合して酢酸エチルエステルになった途端に水溶性が下がるように、カテキン類の場合もC環4位の水酸基のエステル化がその疎水性の増大に寄与していると考えられる。特にECgやEGCgの立体モデルを描いてみるとすべての水酸基の向きとは反対側にエステル部分が突出した構造が推定され、このエステル部分を下向きにしてリン脂質膜に吸着することが十分に考えられる<sup>8)</sup>。さらにEGCgよりはECg、EGCよりはECの吸着量が多かったことは、B環の水酸基の数が、吸着量には負の効果を与えていることを示している。カテキン類の化学構造以外の因子で吸着量に与える効果を調べたところ、塩濃度やリン脂質の荷電が大きく影響することが明らかになった<sup>9)</sup>。すなわちリポソーム懸濁液の塩濃度が高いと吸着量は高くなり(塩析効果)、リポソームを構成するリン脂質(ホスファチジルコリン)に正味で負電荷を示すホスファチジルセリンを10%混入させると吸着量が減少した。これはカテキン類とリン脂質膜との相互作用が疎水結合を基にしていることと、中性水溶液中のカテキン類は一般的なポリフェノールの性質として弱く負に帯電していることから、ホスファチジルセリンに対しては静電的な反発により吸着量が減ったと説明できる。ECgやEGCgは茶の成分でありながら、脂質に対する親和性が高いというのは不思議な結果であるが、両親媒性を示す立体構造に起因していると考えられる。

### 3.2 HPLCを用いた解析

医薬品成分のリン脂質膜への親和性を簡便に評価するため、リン脂質を結合相にもつHPLCカラムが開発された。これを用いて同じ条件における保持時間を測定することにより、4種類のカテキン類の親和性を比較した。その結果、リポソームへの吸着量から得られた親和性の強弱とまったく同じ順番が得られた<sup>10)</sup>。

### 3.3 QCMを用いた解析

以上の方法では4種類のカテキン類のリン脂質に対する親和性に関して、順番はつけられたものの、その結合定数を数値として求めることはできなかった。そこで、水晶発振子マイクロバランス(quartz crystal microbalance, QCM)法を用いて、結合定数の測定を試みた。この方法は水晶発振子の振動数の変化がそこに吸着した物質質量の変化に比例することを利用して結合定数を求めるものである。ここではリン脂質膜をQCMのセルの上にホストとして貼り付け、カテキン類をゲストとして加えた時の振動数変化を経時的に測定した。得られた結合定数は、ECg( $3.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )、EGCg( $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )、EC( $1.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ )、EGC( $1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ )であり、ガレート型カテキン類の結合定数は非ガレート型カテキン類に比べて3ケタ高いことが明らかになった<sup>11)</sup>。これはリポソームを用いた解析の結果を再確認するものであるが、リポソーム法では吸着量が0であったEGCにおいても結合定数が得られたことは、EGCにおいても弱いながらリン脂質と相互作用することを初めて示したことになる。

### 3.4 リポソームにおける存在位置

次にリポソームのどこにカテキン類が存在するかを、脂質蛍光プローブを用いて調べた<sup>7,8)</sup>。2-(9-anthroyloxy)stearic acid (2-AS) や12-(9-anthroyloxy)stearic acid (12-AS)などのステアリン酸を基本骨格に持つ蛍光プローブは、リポソーム中ではカルボキシル基をリポソーム外部の水相に向けた配向性を持って取り込まれ、2-ASの場合はそのプローブがリポソーム表面付近に、12-ASの場合はリポソーム二重層内部の疎水領域に位置する。ここで、カテキン類のような紫外吸収を持つ物質がリポソームに「取り込まれる」と、その近傍に存在する蛍光プローブの蛍光強度を低下させることが予想される。この効果はECgやEGCgにおいて強く、しかも2-ASの場合だけ蛍光強度が低下した。したがって、カテキン類がリポソームの表面に存在することが示唆された。

### 3.5 リポソームの物性に与える影響(抗菌性との関係)

カテキン類の抗菌性や培養細胞に対する増殖阻害活性やアポトーシス誘導活性が知られている。これが実際の生体内で起こるかどうかの判断はさておき、一連の結果はカテキン類が細胞膜の物性変化を通してなんらかの毒性を発現していることを示唆している。そこで、内部の水相に蛍光物質であるカルセインを封じ込めたリポソームを調製して、その漏出を指標にカテキン類の作用を評価した。その結果、ECgやEGCgなどのガレートエステルに明確な漏出

効果が見られた<sup>7,8)</sup>。これは高濃度のカテキン類が細胞膜の物性を変化させることを示している。また、カテキンのアルキル誘導体の抗菌活性を調べたところ、リポソームへの吸着量、n-オクタノール/水系における分配係数、カルセインの漏出とよい相関が見られた<sup>12)</sup>。したがって、カテキン類の抗菌作用に細菌の脂質膜に対する影響が関与していると考えられる。

### 3.6 溶液NMRを用いた解析

カテキン類とリン脂質の相互作用をより直接的な方法で解析するため、溶液NMRと固体NMRを用いた一連の研究を行った。まず等方バイセル (Fig. 3) というリポソームとは異なるモデルリン脂質二重層を用いて、カテキン類の溶液NMRを測定した<sup>13)</sup>。その結果、4種類のカテキン類の中では、ECgとEGCgのNMRスペクトルがバイセルの存在下、大きく変化し、リン脂質 (dimyristoyl phosphatidylcholine, DMPC) 側のプロトンのスペクトルもECgとEGCgの存在下で大きく変化した。しかも、リン脂質のプロトンのうち、ケミカルシフト値が大きく変化したのは、親水性末端 (コリン基) の $\gamma$ -メチル基 (Fig. 2) であり、さらにECgとこの $\gamma$ -メチル基の間で核オウバーハウザー効果 (NOE) が観測されたため、ECgがリン脂質の表面に存在することが確認された。

### 3.7 固体高分解能NMRを用いた解析

生理活性物質とリン脂質膜の相互作用を固体高分解能NMRで調べることにより、溶液NMRとは異なる観点からの情報が得られる。そこで、EGCgを作用させたリン脂質 (DMPCからなるリポソーム) の固体<sup>31</sup>P-NMRスペクトルを測定したところ、EGCgが脂質二重層の表面近くに存在し、リンの運動性に影響を及ぼしていることが明らかになった。次に、EGCgの4位を<sup>2</sup>H (D) でラベルした [4-<sup>2</sup>H]-EGCg (Fig. 4) を合成し、これを用いてEGCgの運動性を解析した。その結果、EGCgは膜に作用し、ある一定の分子配向をもって、膜中に存在していることが明らかとなった<sup>14,15)</sup>。さらに別の実験として、カルボニル炭素を<sup>13</sup>Cで置き換えたECg (Fig. 4) を合成した。この合成プローブを用いて固体高分解能NMR法で解析した結果、多くの情報が得られた<sup>16)</sup>。特に固体NMRによる回転エコー二重共鳴 (Rotational Echo Double Resonance, REDOR) 法を用いて、<sup>13</sup>CでラベルしたECgのカルボニル炭素とリン脂質のリン原子との精密原子間距離を精密測定することに成功し、 $5.3 \pm 0.1 \text{ \AA}$ であることを明らかにした。またこの

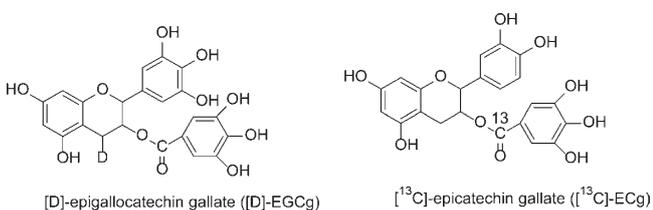


Fig. 4. Structures of D-labelled EGCg and <sup>13</sup>C-labelled ECg

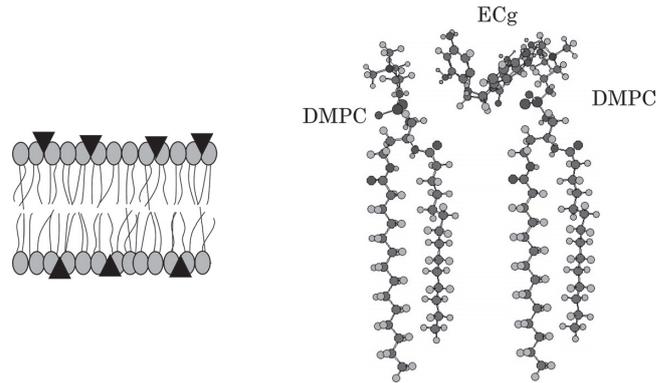


Fig. 5. Interaction of ECg with phospholipids, left: black triangles represent ECgs right: ECg molecule located between DMPCs

系ではリン脂質の $\gamma$ -メチル基の水素原子とリン原子の距離が $4.5 \pm 0.2 \text{ \AA}$ であることが明らかになった。以上の結果はECgがリン脂質分子のごく近く、しかも上部に存在していることを示しており、脂質蛍光プローブを用いた実験の結果など、NMR以外の方法で推定していた内容を検証することができた。以上の結果をまとめるとFig. 5のような分子間相互作用が考えられる。すなわち、ガレート型のカテキン類 (この図ではECg) はリン脂質二重層の表面に存在して、その上を動きまわっており (左の図)、より詳細には、ECgのエステル結合周辺に存在する疎水領域を下に向け、DMPCの $\gamma$ -メチル基との間で疎水的な相互作用が働いていること (右の図) などである。

## 4. 茶カテキン類とタンパク質との相互作用

### 4.1 アルブミン

茶カテキン類は食品 (例えばミルクティー) 中においてはカゼインなどのタンパク質と相互作用することが十分に考えられる。腸管から吸収された後は、高濃度で存在する血清アルブミンとの相互作用が考えられる。我々は牛血清アルブミン (BSA) やヒト血清アルブミンをモデルタンパク質として、カテキン類との分子間相互作用を測定した。まず、ヒト血清アルブミンを結合相に固定化したカラムを備えたHPLCを用いてカテキン類の保持時間を測定したところ、EGCg>ECg>>EGC>ECの順となり<sup>17)</sup>、一方QCMで求めた結合定数は、ECg ( $4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), EGCg ( $4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), EC ( $5.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ), EGC ( $3.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) であった<sup>18)</sup>。どちらの結果もガレート型カテキン類の方が非ガレート型カテキン類よりも、高い親和性を示しており、これはリン脂質の場合と同じである。ただし、HPLCの保持時間の順番がEGCg>ECgとなっていることは、リン脂質の場合と逆である。したがって、カテキン類とリン脂質との相互作用においてはガロイル基の存在と水酸基の数は疎水結合の強さだけに影響するのに対し、タンパク質の場合はガロイル基による疎水結合が相互作用に最も影響する因

子であるものの、B環の水酸基はタンパク質のアミノ酸残基との水素結合にも寄与するため、水酸基が多いEGCgの方がECgよりも保持時間が長くなったと考えられる。以上の結果から、カテキン類とタンパク質との相互作用には、疎水結合以外の他の因子（水素結合、静電的相互作用、立体構造）も関与し、タンパク質ごとに親和性が大きく異なることが予想される。

#### 4.2 アミロイドタンパク質

アミロイドとはアルツハイマー病、パーキンソン病などに関連して見られる物質であり、ペプチドやタンパク質が分子間で会合し、主に $\beta$ -シートからなる線維状構造を形成し沈着する。また分子間会合には主に疎水性相互作用や静電的相互作用が働いていると考えられている。II型糖尿病患者のすい臓 $\beta$ 細胞でもアミロイド沈着物が観察され、それに関わるペプチドとしてislet amyloid polypeptide (IAPP) が同定されている。そのアミノ酸配列は以下のとおりである。

KCNTATCATQRLANFLVHSSNFGAILSTNVGSNTY-NH<sub>2</sub>

この中で20-29のシークエンスがアミロイド形成に重要な役割を果たしており、特に23-27フラグメント (NFGAIL, 以降IAPP22-27と省略) がアミロイド線維を形成する最少単位とされている。このフラグメントは疎水性残基を持つアミノ酸中心に構成されている点の特徴である。これまでに種々の植物ポリフェノールがアミロイド形成を阻害することが報告されているため、茶カテキン類についてIAPP22-27のアミロイド形成に対する影響を調べた<sup>19)</sup>。まずIAPP22-27と茶カテキンの親和性をQCMにより調べたところ、IAPP22-27に対するECgおよびEGCgの結合定数がIAPP22-27どうしより大きく、茶カテキン類がアミロイド形成において阻害剤となりうるようになった。次に、IAPP22-27のアミロイド形成を濁度の経時変化より調べたところ、ECgはアミロイド形成を遅らせた。さらに反応速度解析により、ECgはアミロイド形成における核形成段階を阻害することが明らかになった。また、電子顕微鏡により、IAPP22-27によるアミロイド線維形成を観察し、ECgの存在下では形成された線維の長さが短くなることが証明できた。IAPP22-27の<sup>1</sup>H NMR測定を行い、ECgの有無によるシフト変化を調べたところ、ECg存在下、IAPP22-27の主鎖のNMR信号が変化し、ECgとIAPP22-27の強い相互作用が確認でき、特にIAPP22-27側のPheや、ECgのガロイル基やB環の関与が示唆された。II型糖尿病患者のすい臓 $\beta$ 細胞におけるアミロイド沈着に関して、茶あるいは茶カテキンの飲用が抑制効果を示すかどうかについては、今後のin vivo研究を待つ必要があるが、少なくともこの実験結果は、カテキン類はアミノ酸6残基程度の短いペプチドに対しても高い親和性を示し、それが疎水性相互作用によることを示唆している。これは他のタンパク質との相互作用を考える上で参考となろう。

## 5. 分子間相互作用と味質との関係

茶カテキンは苦味と渋味を合わせ持つため、味質の正確な評価は困難であるが、苦味は舌細胞の表面に発現している味覚受容体で特異的に認識される感覚、渋味は舌細胞の細胞膜（すなわちそこに存在するリン脂質あるいはタンパク質）あるいは唾液に含まれるタンパク質との非特異的な相互作用により認識される感覚として区別することができる。最近の研究により、ヒトの苦味受容体25種類を個別に発現した細胞系が開発され、そのうちの1種類がカテキン類に対して応答することが明らかになった。4種類のカテキン類の中ではECgが1番強く、それにEGCgが続いていた<sup>20)</sup>。すなわち、リン脂質やタンパク質に対する親和性と同様の結果が得られている。また、渋味に関してはリン脂質のポリマーを用いた評価系が開発され、ここでもECgやEGCgなどのガレートエステルの高い吸着量が明らかになっている。このように、苦味と渋味に関しても、カテキン類とリン脂質やタンパク質との相互作用が大きな因子となっていることは間違いのないと思われる。

## 6. 謝 辞

本総説で述べた内容は、筆者が静岡県立大学で行った一連の研究の成果をまとめたものである。当該の研究は、筆者と同じ研究室（食品製造工学・食品機能学・食品分子工学）に在籍した（あるいは在籍している）教員の、橋本啓博士、熊澤茂則博士、上平（石島）美弥博士、石井剛志博士の指導のもと、大学院博士課程に在籍した加治屋勝子博士、植草義徳博士、森大気博士に加えて、多くの修士課程の大学院生と学部学生の熱意と努力、さらに学内外の多くの共同研究者の協力と支援のもとに成し遂げられたものである。この機会に心から感謝の意を表明したい。

## 引用文献

- 1) MIURA, S., WATANABE, J., TOMITA, T., SANO, M., and TOMITA, I. (1994). The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1567-1572.
- 2) YOKOZAWA, T., CHO, E.J., HARA, Y., and KITANI, K. (2000). Antioxidative activity of green tea treated with radical initiator 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5068-5073.
- 3) OKABE, S., SUGANUMA, M., HAYASHI, M. SUEOKA, E., KOMORI, A., and FUJIKI, H. (1997). Mechanisms of growth inhibition of human lung cancer cell line, PC-9, by tea polyphenols. *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 639-643.
- 4) TEZUKA, M., SUZUKI, H., SUZUKI, Y., HARA, Y., and OKADA, S. (1997). Inactivation effect of tea leaf

- catechins on human type-A influenza virus. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **43**, 311-315.
- 5) TACHIBANA, H., KOGA, K., FUJIMURA Y., and YAMADA K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCg. *Nature Struc. Mol. Biol.*, **11**, 380-381.
  - 6) NAKAYAMA, T., ONO, K., and HASHIMOTO, K. (1998). Affinity of antioxidative polyphenols for lipid bilayers evaluated with a liposome system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1005-1007, 1998.
  - 7) HASHIMOTO, T., KUMAZAWA, S., NANJO, F., HARA, Y., and NAKAYAMA, T. (1999). Interaction of tea catechins with lipid bilayers investigated with liposome systems. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2252-2255.
  - 8) KAJIYA, K., KUMAZAWA, S., and NAKAYAMA, T. (2001). Steric effects on interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2638-2643.
  - 9) KAJIYA, K., KUMAZAWA, S., and NAKAYAMA, T. (2002). Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2330-2335.
  - 10) UEKUSA, Y., TAKESHITA, Y., ISHII, T., and NAKAYAMA, T. (2008). Partition coefficients of polyphenols for phosphatidylcholine investigated by HPLC with an immobilized artificial membrane column. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 3289-3292.
  - 11) KAMIHIRA, M., NAKAZAWA, H., KIRA, A., MIZUTANI, Y., NAKAMURA, M., and NAKAYAMA, T. (2008). Interaction of tea catechins and lipid bilayer models investigated by quartz-crystal microbalance analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 1372-1375.
  - 12) KAJIYA, K., HOJO, H., SUZUKI, M., NANJO, F., KUMAZAWA, S., and NAKAYAMA, T. (2004). Relationship between antibacterial activity of (+)-catechin derivatives and their interaction with model membrane. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1514-1519.
  - 13) UEKUSA, Y., KAMIHIRA, M., and NAKAYAMA, T. (2007). Dynamic behavior of tea catechins interacting with lipid membranes as determined by NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 9986-9992.
  - 14) KUMAZAWA, S., KAJIYA, K., NAITO, A., SAITO, H., TUZI, S., TANIO, M., SUZUKI, M., NANJO, F., SUZUKI, E., and NAKAYAMA, T. (2004). Direct evidence of interaction of a green tea polyphenol, epigallocatechin gallate, with lipid bilayers by solid-state nuclear magnetic resonance. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1743-1747.
  - 15) KAJIYA, K., KUMAZAWA, S., NAITO, A., and NAKAYAMA, T. (2008). Solid-state NMR analysis of the orientation and dynamics of epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, incorporated into lipid bilayers. *Magn. Reson. Chem.*, **46**, 174-177.
  - 16) UEKUSA, Y., KAMIHIRA-ISHIJIMA, M., SUGIMOTO, O., ISHII, T., KUMAZAWA, S., NAKAMURA, K., TANJI, K., NAITO, A., and NAKAYAMA, T. (2011). Interaction of epicatechin gallate with phospholipid membranes as revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1654-1660.
  - 17) ISHII, T., MINODA, K., BAE, M.-J., MORI, T., UEKUSA, Y., ICHIKAWA, T., AIHARA, Y., FURUTA, T., WAKIMOTO, T., KAN, T., and NAKAYAMA, T. (2010). Binding affinity of tea catechins for HSA : Characterization by high-performance affinity chromatography with immobilized albumin column. *Mol. Nutr. Food Res.*, **54**, 816-822.
  - 18) MINODA, K., ICHIKAWA, T., KATSUMATA, T., ONOBORI, K., MORI, T., SUZUKI, Y., ISHII, T., and NAKAYAMA, T. (2010). Influence of the galloyl moiety in tea catechins on binding affinity for human serum albumin. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **56**, 331-334.
  - 19) KAMIHIRA-ISHIJIMA, M., NAKAZAWA, H., KIRA, A., NAITO, A., and Nakayama, T. (2012). Inhibitory mechanism of pancreatic amyloid fibril formation : Formation of the complex between tea catechins and the fragment of residues 22-27. *Biochemistry*, **51**, 10167-10174.
  - 20) NARUKAWA, M., NOGA, C., UENO, Y., SATO, T., MISAKA, T., and WATANABE, T. (2011). Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **405**, 620-625.
-

## Molecular interaction of tea catechins with biological substances

Tsutomu NAKAYAMA

Laboratory of Agricultural Foods, Department of Food Science and Technology  
Nippon Veterinary and Life Science University

### Abstract

Green tea mainly contains four catechins, (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin gallate (ECg) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCg). Molecular interactions of tea catechins with phospholipid membranes and proteins were investigated with liposomes or by HPLC, QCM, and NMR. ECg and EGCg show higher affinity for lipid bilayers and proteins than EC and EGC. This means that the presence of galloyl moiety in these compounds enhances affinities for lipid bilayers and proteins. Interactions of EGCg and ECg with phospholipid bilayers were analyzed in detail by solution NMR and solid-state NMR. These studies indicate that the catechin molecules in the surface of the phospholipid bilayers are located closely to the  $\gamma$ -methyl of phosphatidylcholine with hydrophobic interactions. These interactions should have certain roles in the bitterness and astringency of catechins.

**Key words** : catechins, phospholipids, molecular interaction

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ., **62**, 1-7, 2013.