

Epigallocatechin gallate の膜傷害作用に関する研究

—polymyxin B との比較—

生貝 初¹⁾・原 征彦²⁾・大鶴 洋¹⁾・島村 忠勝¹⁾

¹⁾ 昭和大学医学部細菌学教室*

²⁾ 三井農林株式会社食品総合研究所

(平成 10 年 1 月 8 日受付・平成 10 年 3 月 23 日受理)

チャ *Camellia sinensis* の葉抽出液に含まれる (-)epigallocatechin gallate (EGCg) の膜傷害作用機構について研究した。EGCg の *Staphylococcus aureus* に対する吸着量は *Escherichia coli* や *Salmonella Typhimurium* に比べて約 1.5~3 倍多く、グラム陽性菌とグラム陰性菌に対する EGCg の抗菌作用の差が菌体への EGCg の吸着量に依存していることが示唆された。また、*S. Typhimurium* の wild 株 (SL 696) は lipopolysaccharide (LPS) 変異株 (SL 1069, TA 2168) より EGCg の吸着量が少なく、LPS が EGCg の吸着を阻害していることが考えられた。しかしながら、本研究で用いたサルモネラ菌株の間では EGCg の minimum inhibitory concentration (MIC) に差が認められなかった。次に、膜傷害性抗菌物質 polymyxin B (PL-B) と EGCg の膜傷害活性について比較した。Phosphatidylcholine (PC) リポソーム膜に含まれる phosphatidylserine (PS) 濃度の増大に伴ってリポソームに内包された蛍光物質 5, 6-carboxyfluorescein (CF) の EGCg による放出は抑制され、PC と PS のモル比が 19: 1 になると CF の放出はほとんど起こらなくなった。一方、PC リポソーム膜中の PS 含量の増大に伴い PL-B によるリポソームからの CF 放出が増加した。これらの結果から、EGCg はマイナスの net charge を持ち、プラスの電荷を持つ細菌の膜成分に結合後、膜傷害を引き起こす可能性が示唆された。

Key words: (-)epigallocatechin gallate, membrane damage, polymyxin B

ツバキ科 *Theaceae* のチャ *Camellia sinensis* の葉を原料とした茶の抽出液に含まれる catechin は多様な生理活性を持つ物質であることが知られている¹⁻⁵⁾。その中で微生物学的見地に立った研究から、catechin は抗菌作用⁶⁻¹²⁾、抗ウイルス作用¹³⁻¹⁵⁾、抗真菌作用^{16,17)}、毒素阻害作用^{6,18)}を持つことが明らかにされてきた。Flavan-3-ols を母核とする catechin は、C 環 2 位や 3 位に pyrogallol 基や gallate 基がそれぞれ付加されると、生理活性が増強される^{5,6,18,19)}。特に、(-)epigallocatechin gallate (EGCg) は pyrogallol 基と gallate 基を併せて持つために、catechin の中で抗微生物作用⁶⁾や毒素阻害作用¹⁸⁾がもっとも強い。Catechin の抗菌作用は細菌細胞膜の脂質二重層構造を破壊することによって引き起こされると考えられている²⁰⁾。さらに catechin による真菌細胞膜の傷害も電子顕微鏡の超微細構造の研究から明らかにされた¹⁷⁾。

本稿では細菌やリポソームに対して EGCg と膜傷害性抗菌物質である polymyxin B との比較検討を行い、EGCg の抗菌作用に関する新しい知見が得られたので報告する。

I. 材料と方法

1. 材料

EGCg は既報²¹⁾によって緑茶(三井農林, 藤枝)抽出液から分離精製されたものを使用した。EGCg の構造は Fig. 1 に示した。Polymyxin B sulfate (PL-B), phosphatidylcholine (PC) および phosphatidylserine (PS) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。

2. 供試菌

Staphylococcus aureus ATCC 25932, *Escherichia coli* K-12 G 6, ならびに中江太治博士(東海大学)より供与された *Salmonella Typhimurium* SL 696 (野生株), *S. Typhimurium* SL 1069 (LPS 一部欠損株; 構造, KDO-Hep-Hep-Glc), *S. Typhimurium* TA 2168 (KDO のみで polysaccharide を持たない株) を実験に用いた。

3. EGCg 吸着試験

各供試菌を 10 ml の L-broth (tryptone 10g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g per 1,000 ml, pH 7.2) に接種し、37℃, 100 rpm で一昼夜振盪前培養した。この培養液を 37℃ に保温した L-broth (90 ml) に混和し、240 rpm, 37℃ で 3.5 時間培養後、150 mM NaCl/5

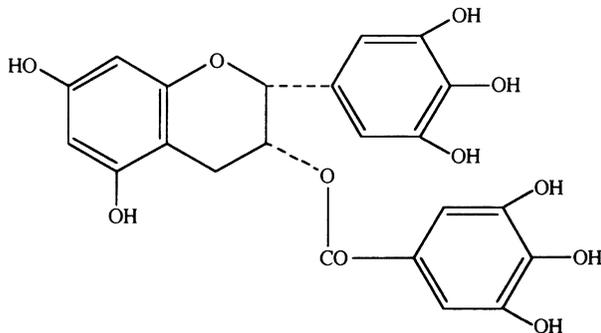


Fig. 1. Structure of (-) epigallocatechin gallate.

mM HEPES 緩衝液 (pH 7.2) で菌体を 1 回洗浄後、0.5% (v/v) になるように上記 HEPES 緩衝液で懸濁し、菌液を調整した。次に、0.5% 菌液 (1 ml) に最終濃度が $50 \mu\text{M}$ になるように EGCg を加え、指示された時間 37°C で静置培養した。水中で 30 秒間冷却後、 $10,000 \text{ rpm}$, 4°C で 5 分間遠心し、EGCg の吸収波長である 280 nm で上清の吸収を測定した。EGCg の供試菌への吸着は次式のように計算した。

$$\text{吸着 (\%)} = (A_{280} \text{ at } 0 - A_{280} \text{ at the indicated time} / A_{280} \text{ at } 0) \times 100$$

4. 抗菌薬感受性試験

EGCg と PL-B の minimum inhibitory concentration (MIC) は 1.5% 寒天加 L-broth を用いて 2 倍希釈法で調べた²²⁾。

5. 5,6-carboxyfluorescein 封入リボソームの作製

PC ($7.5 \mu\text{mol}$) を 15 ml のガラススピッツ管壁にコートし、真空下でクロロフォルムを吸引除去後、 110 mM 5,6-carboxyfluorescein (CF) を含む 1 ml の $150 \text{ mM NaCl}/5 \text{ mM HEPES}$ 緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、超音波破碎器 (Branson Sonifer-200) で 20 W , 10 分間超音波処理して CF 封入リボソームを作製した²³⁾。さらに、このリボソーム液を $150 \text{ mM NaCl}/5 \text{ mM HEPES}$ 緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した Sephadex G-15 ($1 \times 30 \text{ cm}$) を用いて CF 封入リボソームを分離した。

II. 成績

1. EGCg の細菌への吸着

グラム陰性菌はグラム陽性菌に比べ catechin に対する感受性が低い。その原因の 1 つとして catechin の菌体への吸着量がグラム陽性菌とグラム陰性菌の間で異なるのではないかと考え、EGCg の菌体への吸着量を調べた (Fig. 2)。 $50 \mu\text{M}$ EGCg の細菌 (0.5% v/v) への吸着は約 2 分で平衡状態に達し、その後わずかな増加していくことがわかった。4 時間後には *E. coli* や *S. Typhimurium* に対する EGCg の吸着量は約 15~30%、一方 *S. aureus* に対しては約 45% に達し、ここで用いたグラム陰性菌に比べて約 1.5~3 倍多く吸着することがわかった。また、*S. Typhimurium* の lipopolysaccharide (LPS) 変異株 SL 1069 および TA

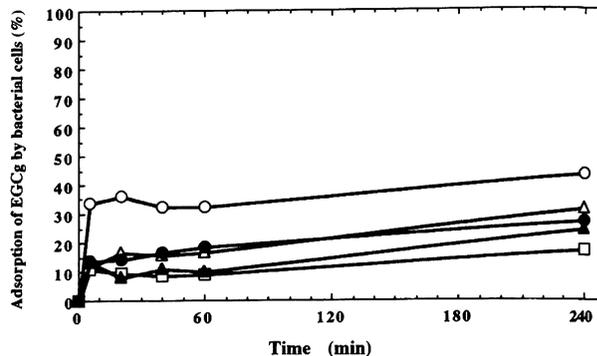


Fig. 2. Adsorption of (-) epigallocatechin gallate by bacterial cells. *Staphylococcus aureus* (○), *Escherichia coli* (△), *Salmonella Typhimurium* SL696 (□), *S. Typhimurium* SL1069 (●), *S. Typhimurium* TA2168 (▲).

Table 1. Antibacterial effect of EGCg^{a)} and PL-B^{b)}

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	EGCg	PL-B
<i>S. aureus</i> ATCC 25932	147	— ^{c)}
<i>E. coli</i> K 12 G 6	590	1.25
<i>S. Typhimurium</i> SL 696	293	1.25
<i>S. Typhimurium</i> SL 1069	293	0.63
<i>S. Typhimurium</i> TA 2168	293	0.63

^{a)} EGCg: (-) epigallocatechin gallate

^{b)} PL-B: polymyxin B

^{c)} —: PL-B had no effect against *S. aureus*.

2168 は wild 株 SL 696 に比べて EGCg の吸着が多く、LPS 中の polysaccharide 部分が EGCg の菌体への吸着を物理的に妨げていることが示唆された。しかしながら、EGCg の MIC は *Salmonella* 属の間で差が認められなかった (Table 1)。

2. EGCg の膜傷害作用における膜電荷の影響

EGCg のリボソーム膜傷害活性は膜表面がマイナスに荷電している場合、抑制されていくが、プラスへ増加していく場合はこの活性にほとんど影響しない。我々は EGCg による膜傷害の機構を明らかにするために、膜表面をマイナスに荷電したリボソームを用い、PL-B と EGCg の膜傷害活性の比較検討を行った。

PC リボソーム膜に含まれる PS 量が増大するにつれて EGCg による膜傷害が減少し、リボソーム中に内包された蛍光物質 CF の放出量が抑制された (Fig. 3)。しかし、PS 含量が 2.5 から 5 mol% の間で急速に CF 放出が減少し、5 mol% の PS が PC リボソーム膜に含まれていると CF の放出がほとんど起こらなかった。一方、PL-B は PC リボソーム膜中の PS 含量の増大に伴い、逆にリボソームからの CF の放出が増加した (Fig. 4)。

III. 考察

EGCg がグラム陰性菌と比較してグラム陽性菌に強

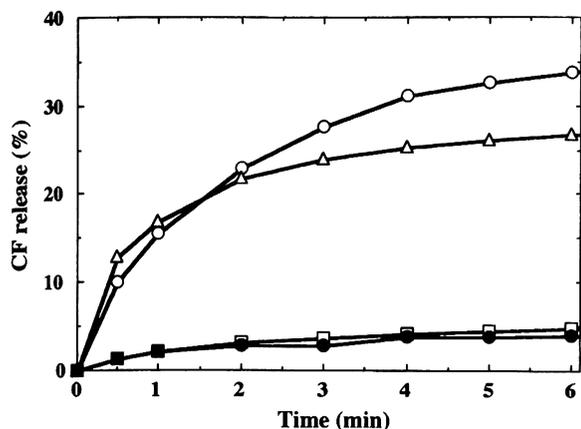


Fig. 3. (-)Epigallocatechin gallate (EGCg)-caused leakage of 5, 6-carboxyfluorescein from phosphatidylcholine (PC) liposomes. Liposome membranes were prepared from PC (○), 97.5 mol% PC plus 2.5 mol% phosphatidylserine (PS) (△), 95 mol% PC plus 5 mol% PS (□), or 92.5 mol% PC plus 7.5 mol% PS (●). EGCg was added at 293 μ g/ml.

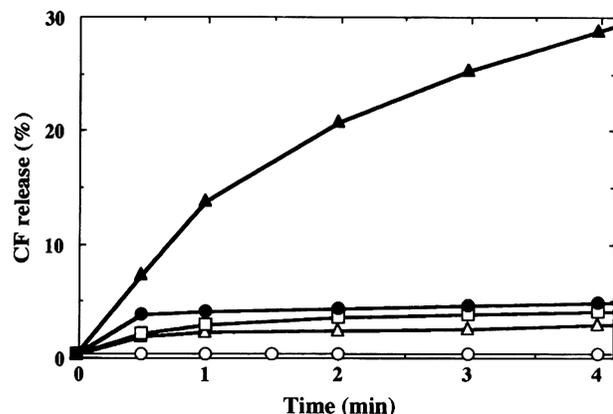


Fig. 4. Polymyxin B (PL-B)-caused leakage of 5, 6-carboxyfluorescein from phosphatidylcholine (PC) liposomes. Liposome membranes were prepared from PC alone (○), 97.5 mol% PC plus 2.5 mol% phosphatidylserine (PS) (△), 95 mol% PC plus 5 mol% PS (□), 92.5 mol% PC plus 7.5 mol% PS (●), or PS alone (▲). PL-B was added at 1 μ g/ml.

い抗菌効果を示す原因の1つがEGCgの菌体への結合量の違いであり、その結合をLPSが阻害していることを明らかにした。このことから、catechinの菌体への吸着が各細菌のcatechinに対する感受性を決定している要因となっていることは明らかである。またリポソームを用いた実験から、膜中に含まれる酸性リン脂質であるPSが増加していくとEGCgの作用が減少していくことがわかった。これらの結果は次のように説明できる。水溶液中に溶解しているcatechinは溶液のpHが6から7付近ではマイナスに荷電している(原, 未発表)。したがって、EGCgが酸性リン脂質であるPSのマイナス電荷と電気的に反撥しあい、脂質二重層に結合できないことから、PSを含むPCリポソームで

はEGCgによる膜傷害を引き起こされないのではないかと考えられる。同様にグラム陰性菌はグラム陽性菌にないLPSを持ち、その中にマイナスの電荷を有するlipid Aが存在するので、グラム陽性菌に比べてグラム陰性菌はEGCgとの静電反撥が大きくなり、EGCgの結合が低くなると考えられる。しかしながら、原核生物細胞膜に含まれる脂質はphosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, caldiolipine, PSなどのマイナス電荷を持つ酸性リン脂質が主なものであるため、膜全体はマイナスに帯電している²⁴⁾。したがって、EGCgは細菌の細胞膜に結合しにくい性質を持っていることが推測される。

また、グラム陰性菌に関して、次のような2つの結果が得られた。i) *S. Typhimurium*のLPS変異株は野生株SL 696に比べてEGCgが多く結合するにもかかわらず、これらの菌の間でMICに差がなかった。ii) EGCgは*S. Typhimurium* (SL 696)に比べて*E. coli*に対して約2倍も多く結合するにもかかわらず、MICは*E. coli*の方が高かった。これらの結果から、グラム陰性菌はEGCgの結合量と抗菌力が相関しないと考えられた。したがって、グラム陰性菌がグラム陽性菌と比較し、EGCgの抗菌作用に対して抵抗性を示す機構がさらに存在している可能性がある。

我々はさらに鎖環状ペプチド抗生物質で主としてグラム陰性菌の細胞膜に作用し^{25,26)}、膜傷害を引き起こすPL-BとEGCgの抗菌作用について比較検討した。最近、平面膜を用いた実験から、プラスの電荷を持つPL-Bはマイナスに荷電した脂質二重層に結合後、直径約3 nmの孔を開けることが報告された²⁷⁾。したがって、EGCgとPL-Bの間でみられた膜表面の電荷がまったく逆のリポソームに作用する性質は両物質の持つnet chargeの差に起因しているものと考えられた。

また、プラスイオンとマイナスイオンを1つずつ持つ双イオン性のPCで作られたリポソームに対しEGCgは作用し、PL-Bはまったく作用しなかった。PL-Bは双イオン性のPCリポソーム膜に結合できないことから²⁸⁾、結果的にPCリポソームの膜傷害を引き起こされないものと考えられたが、その詳細な理由は明らかではない。1つの可能性として、PO₄よりも極性基のコリンのN⁺の方が膜の外側に位置しているため、リポソーム外液に浮遊するイオン化した物質は立体構造的にこの極性基のプラスの電荷と相互作用しやすいためと考えられる。

結論として、EGCgは膜極性基のプラスイオンに結合しやすい性質を持っていることが考えられた。しかしながら、EGCgがリポソームに結合後、どのようにして膜傷害を引き起こすのかいまだに不明である。PL-Bはリポソーム膜に結合した後、膜融合を誘起することが知られている²⁸⁾。一方、EGCg存在下において細

菌やりポソームは凝集を起こすことが知られている²⁰⁾。その際、膜融合が惹起されれば、膜構造の攪乱が同時あるいは引き続き起る可能性について今後検討する必要があると考えられる。

文 献

- 1) Hamilton-Miller J M T: Antimicrobial properties of tea (*Camellia sinensis* L.). *Antimicrob Agent Chemother* 39: 2375~2377, 1995
- 2) 戸田眞佐子, 島村忠勝: カテキン: 多機能性生体防御物質. *昭和医学会誌* 57: 175~189, 1997
- 3) Kelloff G J, Crowell J A, Hawk E T, et al.: Clinical development plan: tea extracts green tea polyphenols epigallocatechin gallate. *J Cell Biochem* 26S: 236~257, 1996
- 4) Lin Y L, Lin J K: (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor- κ B. *Mol Pharmacol* 52: 465~472, 1997
- 5) Hu Z-Q, Toda M, Okubo S, et al.: Mitogenic activity of (-) epigallocatechin gallate on B-cells and investigation of its structure-function relationship. *Int J Immunopharmac* 14: 1399~1407, 1992
- 6) 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 生貝 初, 他: 茶カテキン類およびその構造類似物質の抗菌作用ならびに抗毒素作用. *日細菌誌* 45: 561~566, 1990
- 7) 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 原 征彦, 他: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* に対するカテキンの抗菌・殺菌作用. *日細菌誌* 46: 839~845, 1991
- 8) 帖佐 浩, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 他: 茶およびカテキンのマイコプラズマに対する抗菌・殺菌作用. *感染症誌* 66: 606~611, 1992
- 9) 堀内善信, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 他: 茶およびカテキンの百日咳菌に対する防御作用. *感染症誌* 66: 599~605, 1992
- 10) Toda M, Okubo S, Ikigai H, et al.: The protective activity of tea catechins against experimental infection by *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol Immunol* 36: 999~1001, 1992
- 11) 高橋雄彦, 蔡 哲, 戸田眞佐子, 他: カテキンによる MRSA に対するオキサシリンの抗菌作用出現. *感染症誌* 69: 1126~1134, 1995
- 12) 大久保幸枝, 佐々木武二, 原 征彦, 他: 腸管出血性大腸菌 O157: H7 に対する catechin の殺菌作用および抗毒素作用. *感染症誌* 72: 211~217, 1996
- 13) Mukoyama A, Ushijima H, Nishimura S, et al.: Inhibition of rotavirus and enterovirus infections by tea extracts. *Jpn J Med Sci Biol* 44: 181~186, 1991
- 14) Nakayama M, Suzuki K, Toda M, et al.: Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols. *Antiviral Res* 21: 289~299, 1993
- 15) 中山幹男, 岩田雅史, 戸田眞佐子, 他: 茶カテキンと特異抗体のインフルエンザウイルスに対する効果. *感染症誌* 70: 1190~1192, 1996
- 16) 大久保幸枝, 戸田眞佐子, 原 征彦, 他: 白癬菌に対する茶およびカテキンの抗菌・殺菌作用. *日細菌誌* 46: 509~514, 1991
- 17) 豊島良枝, 大久保幸枝, 戸田眞佐子, 他: カテキンによる *Trichophyton mentagrophytes* の電子顕微鏡学的変化. *感染症誌* 68: 295~303, 1994
- 18) 生貝 初, 戸田眞佐子, 大久保幸枝, 他: カテキンおよびテアフラビンの構造と溶血毒阻害作用について. *日細菌誌* 45: 913~919, 1990
- 19) Hattori M, Kusumoto I T, Namba T, et al.: Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull* 38: 717~720, 1990
- 20) Ikigai H, Nakae T, Hara Y, et al.: Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1147: 132~136, 1993
- 21) 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫: 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. *日農化誌* 61: 803~808, 1987
- 22) Watanabe M, Inoue M, Mitsuhashi S: In vitro activity of amifloxacin against outer membrane mutants of the family *Enterobacteriaceae* and frequency of spontaneous resistance. *Antimicrob Agent Chemother* 33: 1837~1840, 1989
- 23) Ikigai H, Nakae T: Assembly of the α -toxin-hexamer of *Staphylococcus aureus* in the liposome membrane. *J Biol Chem* 262: 2156~2160, 1987
- 24) 徳田 元: 細胞質膜. 図解微生物学ハンドブック (石川辰夫, 駒形和男, 杉山純多, 田中健治, 堀 寛, 水島昭二, 柳田友道編), p.55~69, 丸善, 東京, 1990
- 25) Storm D R, Rosenthal K S, Swanson P E: Polymyxin and related peptide antibiotics. *Ann Rev Biochem* 46: 723~763, 1977
- 26) Vaara M, Vaara T: Polycations as outer membrane-disorganizing agents. *Antimicrob Agent Chemother* 24: 114~122, 1983
- 27) Schroder G, Brandenburg K, Seydel U: Polymyxin B induces transient permeability fluctuations in asymmetric planar lipopolysaccharide/ phospholipid bilayers. *Biochemistry* 31: 631~638, 1992
- 28) Cajal Y, Ghanta J, Easwaran K, et al.: Specificity for the exchange of phospholipids through polymyxin B mediated intermembrane molecular contacts. *Biochemistry* 35: 5684~5695, 1996

Mechanism of membrane damage by (-) epigallocatechin gallate: comparison with polymyxin B

Hajime Ikigai¹⁾, Yukihiro Hara²⁾, Hiroshi Otsuru¹⁾
and Tadakatsu Shimamura¹⁾

¹⁾ Department of Microbiology and Immunology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa, Tokyo 142-8555, Japan

²⁾ Food Research Institute, Mitsui Norin Co. Ltd.

We studied the mechanism of membrane damage induced by (-) epigallocatechin gallate (EGCg) isolated from extracts of *Camellia sinensis* (green tea). The amount of EGCg adsorbed by *Staphylococcus aureus* was 1.5 to 3 times as much as that of EGCg adsorbed by *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. This result indicates that the difference in antibacterial activity of EGCg between Gram-positive and Gram-negative bacteria depends on the amount of EGCg adsorbed across the surface of these organisms. The adsorption of EGCg to *S. Typhimurium* wild type (SL696) was lower than that of EGCg to *S. Typhimurium* lipopolysaccharide (LPS) mutants (SL1069 and TA2168). This result suggests that LPS on outer membranes of Gram-negative bacteria inhibit adsorption of EGCg to the surface of organisms. There were, however, no significant differences in MIC of EGCg among these strains of *S. Typhimurium*. To further explore the mode of action of EGCg, we compared the membrane-damaging activities of EGCg and polymyxin B (PL-B). EGCg damaged phosphatidylcholine (PC) liposome membranes and caused leakage of 5, 6-carboxyfluorescein (CF) encapsulated in the liposomes. However, phosphatidylserine (PS) contained in PC liposomes inhibited CF-release dose-dependently, and the release was inhibited at 5 mol% of PS. On the other hand, CF-release from PC liposomes caused by PL-B was in proportion to the amount of PS contained in the liposome membrane. It seems that the membrane damage induced by EGCg and PL-B depends on the electrical property of the material. We, therefore, assume that the net charge of EGCg is negative, since positively-charged PL-B binds negatively-charged lipid bilayers.