

[成果情報名]チャのメチル化カテキン生合成酵素 CsOMT の cDNA 単離と特性

[要約]「べにふうき」生葉から単離した cDNA から推定されるメチル化カテキン生合成酵素 CsOMT(*Camellia sinensis* O-methyltransferase)は 27.6KDa の分子量を持ち、EGCG に反応して 3 種のメチル化カテキンを生成する。

[キーワード]べにふうき、メチル化カテキン、O-メチルトランスフェラーゼ

[担当]野菜茶研・野菜・茶機能性研究チーム

[代表連絡先]電話 0547-45-4964

[区分]野菜茶業・茶業、食品

[分類]研究・参考

---

[背景・ねらい]

「べにふうき」茶葉中の epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate (EGCG<sup>3</sup>Me)等のメチル化カテキンは強い抗アレルギー作用を持ち、作用機作、代謝などが明らかになってきている。しかし、なぜ特定の品種だけがメチル化カテキンを多量に含有するのかなど解明されていない部分も多い。

「べにふうき」生葉中のメチル化カテキン生合成酵素を明らかにすることで、メチル化カテキンの生合成経路の解明、メチル化カテキン高含有品種の特性解明やメチル化カテキンの合成制御技術の開発に結びつける。

[成果の内容・特徴]

1. 「べにふうき」生葉から RACE-PCR 法で単離した cDNA から推定されるメチル化カテキン生合成酵素 CsOMT(*Camellia sinensis* O-methyltransferase)のアミノ酸配列は、タバコ、パセリ、ブドウで報告されているカフェオイル-CoA-O-メチルトランスフェラーゼと 89%以上の高い相同性を持つ (図 1)。
2. CsOMT の cDNA は 245 アミノ酸をコードする 735 塩基からなっている (図 1)。
3. CsOMT の cDNA を大腸菌に導入して発現させた酵素の分子量は 27.6KDa である (図 2)。
4. 基質として EGCG350mM を、メチル基供与体として SAM (S-adenosylmethionine) 800mM を用い、大腸菌発現粗酵素 1ml と 37°Cで一晩反応させると、EGCG の約 40%が EGCG<sup>3</sup>,5<sup>di</sup>Me に、約 7%が EGCG<sup>3</sup>Me に、約 2%が EGCG<sup>4</sup>Me に変換される。基質に対する SAM の割合を 2 倍及び 5 倍に変えると、EGCG<sup>3</sup>Me の生成量はほとんど変化しないのに対し、EGCG<sup>3</sup>,5<sup>di</sup>Me の生成量は約 2.5 倍及び 4.5 倍に増加する (図 3)。

[成果の活用面・留意点]

1. 本酵素を用いてメチル化カテキンの生合成 (バイオリクターレベル) が可能となり、生葉中ではほとんど検出されない EGCG<sup>3</sup>,5<sup>di</sup>Me を生成させることができる。EGCG に対する SAM の割合を 5 倍以上にしても EGCG<sup>3</sup>,5<sup>di</sup>Me 生成量は極端に増加しない。

[具体的データ]

CsOMT	1	MAIINGEGEQLNRHCEVGVGHKSLLSQSDALYQVILETSVYPREPEPMKELREVTAKHPWNI	60
<i>N. tobacum</i>	1	MAIINGENG---RHCEVGVGHKSLLSQSDALYQVILETSVYPREPEPMKELREITAKHPWNI	57
<i>P. crispum</i>	1	MASNGEESK---HSEVGVGHKSLLSQSDALYQVILETSVYPREPEPMKELREVTAKHPWNI	56
<i>V. vinifera</i>	1	MAIINGEAG---RHCEVGVGHKSLLSQSDALYQVILETSVYPREPEPMKELRELTAKHPWNI	57
CsOMT	61	TSADBEQQLNMLLKLINAKNTMEIGVYVFGYSLLATLALPDDGKILAMDINRNFYI	120
<i>N. tobacum</i>	58	TSADBEQQLSMLLKLINAKNTMEIGVYVFGYSLLATLALPDDGKILAMDINRNFYI	117
<i>P. crispum</i>	57	TSADBEQQLNMLLKLINAKNTMEIGVYVFGYSLLATLALPDDGKILAMDINRNFYI	116
<i>V. vinifera</i>	58	TSADBEQQLNMLLKLINAKNTMEIGVYVFGYSLLATLALPDDGKILAMDINKNYI	117
CsOMT	121	IIEKAGVAHKIDREKGPALPALLDMIEDGKHGSGDFIFVDADKDNLYNYHKRLIDL	180
<i>N. tobacum</i>	118	VIEKAGLAHKIEKREKGPALFVLLDMIEDGKHGSGDFIFVDADKDNLYNYHKRLIDL	177
<i>P. crispum</i>	117	IIEKAGVGHKIDREKGPALFVLLDMIEDGKHGSGDFIFVDADKDNLYNYHKRLIDL	176
<i>V. vinifera</i>	118	VIEKAGVAHKIDREKGPALFVLLDMIEDGKHGSGDFIFVDADKDNLYNYHKRLIDL	177
		motif A	
CsOMT	181	GGELIGYDNTLWNGSVVAFPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIETOMLPV	240
<i>N. tobacum</i>	178	GGELIGYDNTLWNGSVVAFPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADSRITCQLPV	237
<i>P. crispum</i>	177	GGELIGYDNTLWNGSVVAFPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIETOMLPV	236
<i>V. vinifera</i>	178	GGELIGYDNTLWNGSVVAFPPDAPLRKYVRYRDFVIELNKALAADPRIETOMLPV	237
		motif B	motif C
CsOMT	241	CRRVC	245
<i>N. tobacum</i>	238	CRRIS	242
<i>P. crispum</i>	237	CRRIS	241
<i>V. vinifera</i>	238	CRRLS	242

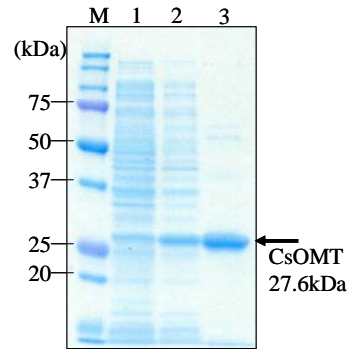


図2 CsOMT の cDNA を大腸菌で発現させて得られた酵素の電気泳動パターン  
M:分子量マーカー、1:IPTG (Isopropylthiogalactoside)非誘導粗酵素  
2: IPTG 誘導粗酵素 3: 精製酵素

図1 「べにふうき」茶葉から単離した cDNA から推定されるメチル化カテキン生成酵素 CsOMT のアミノ酸配列

CsOMT;本酵素、*N.tobacum P.crispum V.vinifera* はタバコ、パセリ、ブドウのカフェオイル-CoA-O-メチルトランスフェラーゼ(CCoAOMT),白抜きで示したアミノ酸配列は4種間で完全に一致した個所を示し、モチーフA,B,Cはメチル基供与体であるSAM結合ドメインを表す

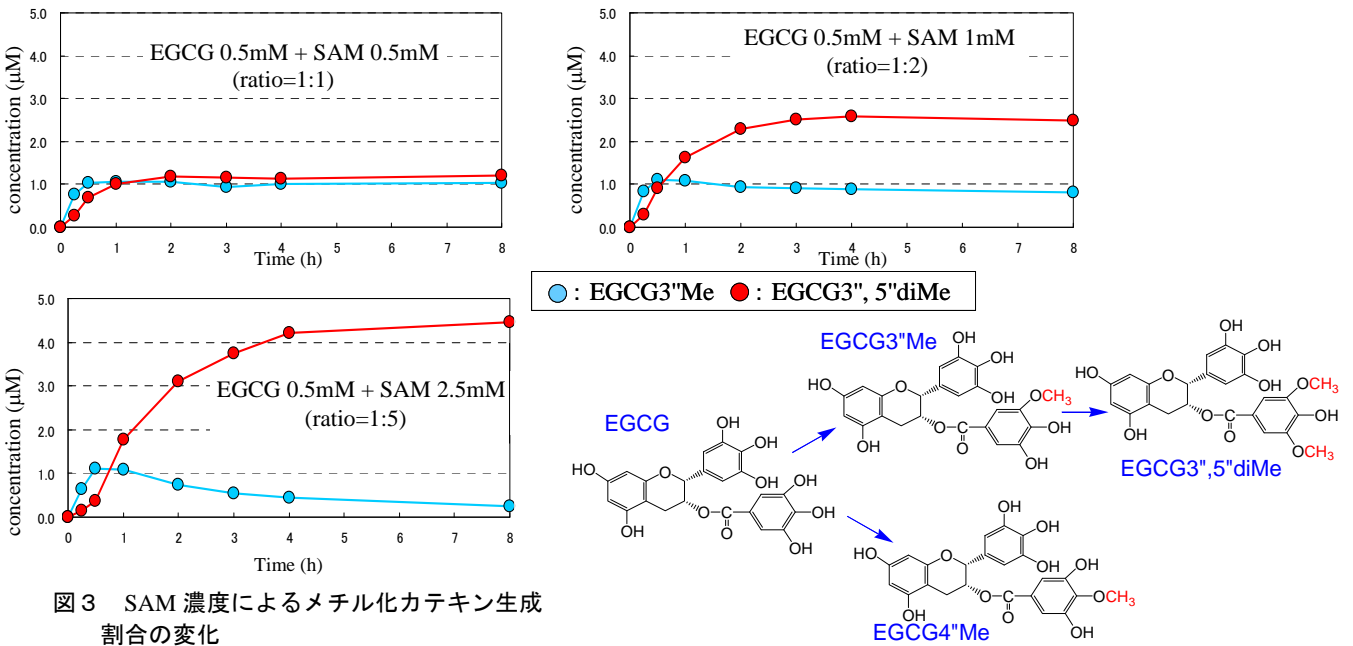


図3 SAM濃度によるメチル化カテキン生成割合の変化

[その他]

研究課題名：野菜・茶の免疫調節作用、生活習慣病予防作用を持つ機能性成分の評価法と利用技術の開発

課題ID : 312-b

予算区分 : 基盤研究費

研究期間 : 2003~2007年度

研究担当者：山本（前田）万里、切田雅信（アサヒビール）、本間大樹（アサヒビール）

発表論文等：山本ら(2006)「メチル化カテキン生成酵素をコードする遺伝子」特開 2006-141242