メチル化カテキンによるスギ花粉アレルギー性疾患予防と生活環境改善に関する研究

2017 年 1 月

切田　雅信

メチル化カテキンによるスギ花粉アレルギー性疾患予防と生活環境改善に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
持続環境学専攻
博士（環境学）学位論文

切田　雅信

要旨

日本では約 60 年前からスギが積極的に植林され、それに伴う環境の変化により、アレルギー疾患に悩む人が急増している。また、スギ花粉の形成量は前年の夏の気温に影響されるため、近年の環境変化にも大きく影響されている。花粉症への対策として薬物による治療が行われているが、副作用が懸念されている。ことから、副作用が無く、日常的に摂取可能な食品成分による予防や症状の軽減等が望まれている。

茶は世界中で古くから飲用されている代表的な飲料である。茶にはカテキンが含まれており、その主成分のエピガロカテキンガレート (EGCG) は、様々な機能性の研究が報告されている。独立行政法人野菜茶業研究所 (当時。現在、農研機構食品研究部門) の山本博士らはこの茶に注目し、抗アレルギー活性を有する茶の探索を行った。その結果、「べにふうき」などの茶品種に強いヒスタミン遊離抑制効果があることを見出した。関与成分を探索したところ、EGCG のメチル化体であるエピガロカテキン 3‐*O*‐メチルガレート (EGCG3″Me) とエピガロカテキン 4‐*O*‐メチルガレート (EGCG4″Me) であることが特定された。しかし、その含量は乾燥茶葉重量当たり 1.5% と微量にしか含まれていなかった。本研究ではこのメチル化カテキンの生合成酵素を突き止め、EGCG を基質として酵素変換により製造し、食品素材として提供することを目的とした。

第 2 章では、茶「べにふうき」からのメチル化カテキンの生合成に関与していると思われる遺伝子を単離した。大腸菌を用いて酵素を発現させ、EGCG と反応させた結果、EGCG3″Me と EGCG4″Me が生成された。そのため本遺伝子を新規 *O*-メチルトランスフェラーゼ、*CsOMT* (*Camellia sinensis O*-methyltransferase) とした。また、新たにエピガロカテキン-3-*O*-(3,5-*O*-ジメチル)ガレート (EGCG3″,5″diMe) と 3-*O*-メチルエピガロカテキン-3-*O*-(3,5-*O*―ジメチル)ガレート (EGCG3′,3″,5″triMe) の生成を確認した。しかし、CsOMT は大腸菌を用いて発現させており、食品素材への展開は困難であった。

一方、CsOMT はリグニン合成に関与するカフェオイル CoA *O*ーメチルトランスフェラーゼ (CCoAOMT) と高い相同性した。この情報を手掛かりに新たな酵素の探索を第 3 章で検討した。

CCoAOMT は担子菌ではリグニンの分解に関与している。そのため、食用キノコの菌糸体を培養し、粗酵素を抽出して反応させ、スクリーニングを行った。その結果、*Flammulina velutipes* (エノキタケ) 抽出粗酵素に、メチル化カテキンの生成が確認できた。さらに酵素の精製に成功し、解析した内部アミノ酸配列情報をもとに遺伝子を単離した。ホモロジー検索を行ったところ、他の担子菌の *O*-メチルトランスフェラーゼと相同性を示した。本酵素は *F. velutipes* から単離した初めての酵素であり、*Fv-OMT* (*Flammulina velutipes O*-methyltransferase) とした。Fv-OMT を大腸菌を用いて発現させ、EGCG と反応させたところ、EGCG3″Me、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe の生成を確認し、さらに新たにエピガロカテキン-3-*O*-(3,4-*O*-ジメチル)ガレート (EGCG3″,4″diMe) と 4- *O* -メチルエピガロカテキン-3- *O*-(3,5- *O*－ジメチル) ガレート (EGCG4′,3″,5″triMe) が生成された。また、至適 pH と温度を明らかにするとともに、メチル化カテキン生成の経時的変化を確認した。また、様々なポリフェノールと反応させ、基質特異性を明らかにした。

第 4 章では予備検討ではあるが、メチル化カテキンの工業化を見据え、菌糸体のスケールアップ培養の検討を行った。始めに三角フラスコスケール、次いで 5 L ジャーファーメンター、最終的には 90 L 培養タンクを用いたスケールアップを行い、酵素活性を得ることができた。また、抽出した粗酵素を用いて至適 pH と温度を明らかにし、メチル化カテキン生成の経時的変化を確認した。

第 5 章では、始めにマウスを用いて EGCG3″,5″diMe を 100 mg/kg で単回投与をし、毒性が認められないことを確認した。次に茶の酵素 CsOMT を用いて生成された新規メチル化カテキンの活性評価を行った。マウスマスト細胞を用いたヒスタミン遊離抑制効果を評価したところ、EGCG3′,3″,5″triMe = EGCG3″,5″diMe > EGCG3″Me > EGCG の

順であり、メチル基の数が増えるにつれて、効果が強くなった。さらに EGCG と EGCG3″Me 等に関する文献調査を行い、スギ花粉に対する抗アレルギー活性のメカニズムに対して考察を行った。また、メチル化カテキンは EGCG と比べて高い血漿中濃度を示すことが、抗アレルギー活性を示す一因と考えられる。化合物は脂溶性が高いほど腸管膜を通過して血漿中へ移行しやすくなる。そのため、指標の一つであるオクタノール/水分分配係数を測定した結果、メチル基の数が増えるにつれて脂溶性は増加し、血漿中への良好な移行性が期待できた。また、EGCG の主な活性である抗酸化活性と抗菌活性を評価した。

以上のことから、エノキタケの菌糸体培養物を用い、EGCG を基質としてと反応させることで、メチル化カテキンを生産することが可能となった。これにより、アレルギー患者に対して副作用が無く、日常的に摂取できることで、生活環境の改善に貢献できることが期待できる。さらに新規メチル化カテキンはより強い抗アレルギー活性を示したことから、将来はさらに優位性のある食品素材としての展開が期待できる。

略語及び頭字語

AUC : Area under the drug concentration time curve

CBB : Coomassie brilliant blue

cGMP : Cyclic guanosine monophosphate

CCoAOMT : Caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase

CsOMT : *Camellia sinensis O*-methyltransferase

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EC : (–)-epicatechin

ECG : (–)-epicatechin gallate

EGC : (–)-epigallocatechin

EGCG : (–)-epigallocatechin gallate

EGCG3″Me : (–)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)gallate

EGCG4″Me : (–)-epigallocatechin-3-*O*- (4-*O*-methyl)gallate

EGCG3″,4″diMe : (–)-epigallocatechin-3-*O*-(3,4-*O*-dimethyl)gallate

EGCG3″,5″diMe : (–)-epigallocatechin-3-*O*- (3,5-*O*-dimethyl)gallate

EGCG3′,3″,5″triMe : (–)-3′-*O*-methylepigallocatechin-3-*O*-(3,5-*O*-dimethyl)gallate

EGCG4′,3″,5″triMe : (–)-4′-*O*-methylepigallocatechin-3-*O*-(3,5-*O*-dimethyl)gallate

eEF1A : Eukaryotic translation elongation factor 1A

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinese1/2

HPLC : High Performance Liqud Chromatography

Fv-OMT : *Flammulina velutipes O*-methyltransferase

LC-TOF-MS : Liquid Chromatography-time of flight-mass spectrometry

LC-MS/MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry / Mass Spectrometry

IPTG : Isopropylthiogaractoside

NCBI : National Center for Biotechnology Information

MIC : Minimal Inhibitory Concentration

MRLC : Myosin Ⅱ regulatory light chain

MYPT1 : Myosin phosphatase targeting subunit 1

ORF : Open Reading Frame

PDB : Potato Dextrose Broth

RACE-PCR : Rapid Amplification of cDNA ends

RhoA : Ras homologus gene family member A

RT-PCR : Reverse-Transcreptase polymerase chain reaction

SAM : S-adenosyl-L-methionine

SDS : Sodium dodecyl sulfate

STIM1 : Stromal interaction molecule 1

TNP-BSA : Trinitrophenol-bovine serum albmin

目次

要旨..... i

略語及び頭字語..... iv

目次..... vi

表リスト..... xi

図リスト..... xii

投稿論文..... xiv

第１章：序論..... **1**

第２章：茶品種「べにふうき」からの新規 *O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の同定及びメチル化カテキンの合成..... **6**

２－１．緒言..... **7**

２－２．実験材料及び方法..... **10**

２－２－１．試薬及び試料..... **10**

２－２－２.「べにふうき」からの *O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離..... **10**

２－２－２－１.「べにふうき」からの total-RNA 及び遺伝子断片の単離..... **10**

２－２－２－２. RACE-PCR 法による 5’側遺伝子の離..... **11**

２－２－２－３. RACE-PCR 法による 3’側遺伝子の離..... **12**

２－２－２－４．全塩基配列の定..... **12**

２－２－３．大腸菌を用いた組換え酵素の発現..... **13**

２－２－４．酵素活性及び生成物の分析..... **14**

２－２－５．新規メチル化カテキンの構造解析..... **14**

２－３．結果..... **16**

２－３－１．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離.....**16**
２－３－２．大腸菌を用いた組換え酵素の発現.....**21**
２－３－３．酵素活性及び生成物の分析.....**23**
２－３－４．新規メチル化カテキンの構想解析.....**25**
２－４．考察.....**29**

第３章：「茶品種「べにふうき」からの新規 *O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の同定及びメチル化カテキンの合成.....**31**
３－１．緒言.....**32**
３－２．実験材料及び方法.....**35**
３－２－１．試薬及び試料.....**35**
３－２－２．各種「きのこ」からの菌糸の単離及び培養.....**35**
３－２－３．*O*－メチルトランスフェラーゼ活性の探索.....**35**
３－２－４．*O*－メチルトランスフェラーゼの精製.....**36**
３－２－５．SDS-PAGE、二次元電気泳動による *O*－メチルトランスフェラーゼの精製及びトリプシン処理.....**37**
３－２－６．LC-MS/MS 分析によるアミノ酸配列の解析.....**38**
３－２－７．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離.....**38**
３－２－７－１．「エノキタケ」からの total-RNA 及び遺伝子断片の単離...**38**
３－２－７－２．RACE-PCR 法による 5’側遺伝子の単離.....**40**
３－２－７－３．RACE-PCR 法による 5’側遺伝子の単離.....**40**
３－２－７－４．全塩基配列の決定.....**41**
３－２－８．大腸菌を用いた組換え酵素の発現.....**41**
３－２－９．酵素活性.....**42**
３－２－１０．新規メチル化カテキンの構造解析.....**42**

３－２－１１．*O*－メチルトランスフェラーゼの至適 pH 及び至適温度.....**43**
３－２－１２．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....**43**
３－２－１３．*O*－メチルトランスフェラーゼの基質特異性.....**44**
３－３．結果.....**45**
３－３－１．各種「きのこ」菌糸培養物からの *O*－メチルトランスフェラーゼ活性の探索及び確認.....**45**
３－３－２．酵素精製およびアミノ酸配列の解析.....**47**
３－３－３．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離.....**53**
３－３－４．大腸菌を用いた組換え酵素の発現.....**58**
３－３－５．新規メチル化カテキンの構造解析.....**60**
３－３－６．*O*－メチルトランスフェラーゼの至適 pH 及び至適温度.....**63**
３－３－７．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....**65**
３－３－８．*O*－メチルトランスフェラーゼの基質特異性.....**67**
３－４．考察 **71**

第４章：「エノキタケ」菌糸体のスケールアップ培養の検討.....**77**
４－１．緒言.....**78**
４－２．実験材料及び方法.....**79**
４－２－１．実験材料及び試薬.....**79**
４－２－２．培養菌糸体凍結乾燥物を用いた酵素反応.....**79**
４－２－３．培地の至適 pH の検討.....**79**
４－２－４．培地中の炭素源の検討.....**80**
４－２－５．培地中の窒素源の検討.....**80**
４－２－６．5 L ジャーファーメンターを用いた菌糸体培養方法の検討.....**80**
４－２－７．90 L 培養タンクを用いた検討.....**82**

４－２－８. 培養菌糸体抽出酵素の至適 pH 及び温度.....82
４－２－９. 菌糸体酵素によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....82
４－３. 結果.....83
４－３－１. 培地の至適 pH の検討.....83
４－３－２. 倍地中の炭素源の検討.....85
４－３－３. 倍地中の炭素源の検討.....87
４－３－４. ジャーファーメンターを用いた菌糸体培養方法の検討.....89
４－３－５. 90 L 培養タンクを用いた検討.....91
４－３－６. 培養菌糸体抽出酵素の至適 pH 及び温度.....93
４－３－７. 菌糸体酵素によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....95
４－４. 考察.....96

第５章：新規メチル化カテキンの活性評価.....99
５－１. 緒言.....100
５－２. 実験材料及び方法.....101
５－２－１. 試薬及び資料.....101
５－２－２. マウスを用いた EGCG3″,5″diMe 毒性試験予備検討.....101
５－２－３. ヒスタミン遊離抑制.....101
５－２－４. オクタノール/水分分配係数の測定.....102
５－２－５. ジフェニルピクリルヒドラジルラジカル消去活性.....102
５－２－６. 抗菌活性.....103
５－３. 結果.....105
５－３－１. マウスを用いた EGCG3″,5″diMe 毒性試験予備検討.....105
５－３－２. ヒスタミン遊離抑制.....107
５－３－３. オクタノール/水分分配係数の測定.....109

５－３－４．ジフェニルピクリルヒドラジルラジカル消去活性.....111
５－３－５．抗菌活性.....113
５－４．考察.....115

第６章：総括.....123

引用文献.....128

謝辞.....137

表リスト

表2-1.　構造物C-A及びC-Bの ^{13}C-及び ^{1}H-NMR スペクトル.....**28**

表3-1.　*F. velutipes* からのFv-OMT精製ステップ.....**49**

表3-2.　組換え酵素Fv-OMT反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....**66**

表3-3.　Fv-OMT 組換え酵素を用いて反応させたポリフェノール化合物の LC-TOF-MS 分析.....**70**

表 4-1.　培養スケールの違いによる菌糸体重量及び酵素活性の比較.....**92**

表 4-2. 培養菌糸体抽出粗酵素反応メチル化カテキン生成物の経時的変化.....**96**

表5-1. マウスを用いたEGCG3″,5″diMe毒性試験予備検討.....**106**

表5-2.　DPPHラジカル消去活性.....**112**

表5-3.　EGCG とメチル化カテキンの抗菌活性の比較.....**114**

図リスト

図 1-1. カテキン類及びメチル化カテキンの化学構造.....**5**

図 2-1. *CsOMT* の全塩基配列及び推定アミノ酸残基.....**17**

図 2-2. CsOMT と *N.tobacum*、*P.crispum* 及び *V.vinifera* の CCoAOMT とのアミノ酸配列の比較.....**20**

図 2-3. 大腸菌で発現させた CsOMT 酵素の 12%SDS-PAGE 電気泳動像.....**22**

図 2-4. CsOMT を用いた酵素反応後の HPLC クロマトグラム.....**24**

図 2-5. EGCG3″, 5″diMe と EGCG3′,3″,5″triMe の化学構造.....**27**

図 3-1. *F. velutipes* から抽出した粗酵素を用いた酵素反応物の HPLC クロマトグラム..**46**

図 3-2. エノキタケ培養菌糸体から抽出した酵素の 12%SDS-PAGE 電気泳動像.....**50**

図 3-3. Fv-OMT を Phenyl Sepharose HP カラムで精製した後の活性画分の二次元電気泳動像.....**51**

図 3-4. 解析した内部アミノ酸配列の比較.....**52**

図 3-5. *Fv-OMT* の全塩基配列及び推定アミノ酸残基.....**54**

図 3-6. Fv-OMT のアミノ酸配列と *L. bicolor*、*T. versicolor*、 *D. squalens*、 *S. hirsutum* 及び *C. cinerea* okayama の *O*-メチルトランスフェラーゼとの比較.....**57**

図 3-7. 発現した Fv-OMT 酵素 の 12%SDS-PAGE 電気泳動像.....**59**

図 3-8. Fv-OMT を用いた酵素反応後の HPLC クロマトグラム.....**61**

図 3-9. EGCG3″,4″diMe と EGCG4′,3″,5″triMe の構造式.....**62**

図 3-10. Fv-OMT の至適 pH (1) と至適温度 (2) **64**

図 3-11. 組換え酵素 Fv-OMT 反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....**66**

図 3-12. Fv-OMT によりメチル化したポリフェノール化合物.....**68**

図 3-13. FvOMT によりメチル化が確認されなかったポリフェノール化合物.....**69**

図 3-14. Fv-OMT の基質特異性.....**75**

図 4-1. 培養時に用いた撹拌翼の形状.....**81**
図 4-2. pH の違いによる酵素活性の変化.....**84**
図 4-3. 炭素源の違いによる酵素活性の変化.....**86**
図 4-4. 窒素源の違いによる酵素活性の変化.....**88**
図 4-5. 5 L ジャーファーメンター培養の様子.....**90**
図 4-6.菌糸体を培養した 90 L 培養タンク.....**92**
図 4-7. Fv-OMT の至適 pH (1) と至適温度 (2) **94**
図 4-8. 培養菌糸体抽出粗酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化.....**96**
図 5-1. EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe のマウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制の効果.....**108**
図 5-2. EGCG とメチル化カテキンのオクタノール/水分分配係数の測定結果.....**110**
図 5-3. EGCG 及び EGCG3″Me のスギ花粉に対するヒスタミン遊離抑制のメカニズム.....**119**

投稿論文

M. Kirita, D. Honma, Y. Tanaka, S. Usui, T. Shoji, M. Sami, T. Yokota, M. Tagashira, A. Muranaka, M. Uchiyama, T. Kanda, M. Maeda-Yamamoto. Cloning of a novel *O*-methyltransferase from *Camellia sinensis* and synthesis of *O*-methylated EGCG and evaluation of their bioactivity, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 7196-7201.

M. Kirita, Y. Tanaka, M. Tagashira, T. Kanda, M. Maeda-Yamamoto. Purification and characterization of a novel *O*-methyltransferase from *Flammulina velutipes*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 806-811.

M. Kirita, Y. Tanaka, M. Tagashira, T. Kanda, M. Maeda-Yamamoto. Cloning and characterization of a novel *O*-methyltransferase from *Flammulina velutipes* that catalyzes methylation of pyrocatechol and pyrogallol structures in polyphenols, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79 (2015) 1111-1118.

第１章
緒言

現在、日本ではスギ樹木の植林による環境の変化とそれに伴う生活環境の変化により、アレルギー疾患に悩む人が急増してきている。国として森林の育種を開始したのは約 60 年前からであり、成長が速くて形質が良く、ほぼ垂直に伸びるスギが積極的に植林されてきた。当初は戦後の復興需要に対応するためであり、1960 年以降は住宅等の建築需要に対応する形で植林されてきた。日本の国土面積は 3,799 万 ha であり、その内の森林面積は 2012 年で 2,508 万 ha と国土面積の 2/3 を占めている。森林面積の内の人工林は 1,029 万 ha であり、森林の約 4 割である。その中で花粉症の主な原因であるスギ及びヒノキの植林面積の推移は、1970 年ではスギが 355.4 万 ha、ヒノキが 146.4 万 ha であったが、2012 年ではそれぞれ 447.5 万 ha (人工林の 44%)、259.9 万 ha (人工林の 25%) に増加してる (林野庁、平成 26 年度森林及び林業の動向、平成 27 年度森林及び林業施策資料より、http://www.rinya.maff.go.jp)。日本では 1964 年にスギ花粉症の最初の報告がされている[1]。栃木県日光地方で鼻腔、咽頭及び眼結膜のアレルギー症状を示す患者に対する臨床検査が行われ、スギ花粉症：Japanese Cedar Pollinosis と命名された。そして、植林の増加とともに、スギは樹齢 25～30 年で雄花を多く形成し花粉を飛散させることから、1970 代以降からは花粉によるアレルギー患者の報告も増加した。2008 年 1～4 月の全国疫学調査では、アレルギー性鼻炎全体の有病率は 39.4%であり、花粉症は 29.8%であった。そのうちスギ花粉症の患者は 26.5%であった (環境省、花粉症環境保健マニュアル 2014 資料より)。この有病率は 1998 年と比較すると、10%の増加であった。また、厚生労働省の平成 26 年度傷病別患者年次推移によると、昭和 59 年 (1984 年) の花粉アレルギー性鼻炎の患者数は 300 人であるのに対し、平成 26 年 (2014 年) では 1,300 人に増加している (一定の病院当たりの患者数)。また、気候の変化に伴い、花粉症患者が増加している。スギ花粉の形成量は前年の夏の気候に影響されている。福井県の 1974 年から 1993 年の 7 月の平均気温は 25.1±0.3℃であったが、1994 年から 2012 年では 26.2±0.3℃と有意に上昇しており、それとともに花粉症患者も増加しているという報告がある[2]。これらのことから、スギ花粉症患者の増加は、スギ樹木の急激な増

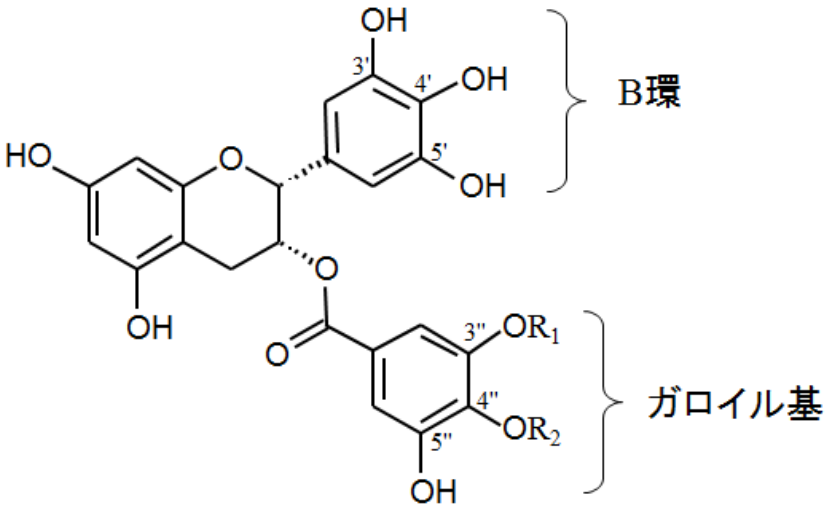
加に伴う森林環境の変化、そして気温の上昇による変化など、身の回りの生活環境の変化が大きな要因であると言える。

花粉症の症状は、主に鼻水、鼻づまり、くしゃみ、眼のかゆみなどであり、日常生活に支障をきたす場合もある。スギ花粉症を含むアレルギー性鼻炎に対する薬物治療方法は、一般的に抗ヒスタミン薬、抗ロイコトリエン薬やステロイドが主に使用されている。しかし薬によっては、口渇、悪心・嘔吐、下痢、めまい、倦怠感、神経過敏、頭痛、眠気等が注意すべき副作用として報告されている (厚生省抗ヒスタミン薬主薬製剤に関する資料４－３１より)。これらのことから、副作用が無く、日常的に摂取可能な食品成分による予防や症状の軽減等が望まれている。

茶 (*Camellia sinensis*) はツバキ科の植物で嗜好飲料として日本をはじめ世界各地で古くから飲用されてきており、近年、この茶から様々な機能性成分が見出されている。機能性を発揮する主成分として、主要ポリフェノールであるカテキン類があげられる。カテキン類の主成分はエピカテキン ((–)‐epicatechin、EC)、エピガロカテキン ((–)‐epigallocatechin、EGC)、エピカテキンガレード ((–)‐epicatechin gallate、ECG) 及びエピガロカテキンガレート ((–)‐epigallocatechin gallate、EGCG) であり、EGCG はカテキンの 50～60%を占めることから、カテキン類の中でも最もその機能性の研究対象となっている[3]。これらのカテキンに関しては、抗癌作用[4]、抗変異原活性[5]、抗菌活性[6]、抗ウイルス活性[7]、ラジカル消去活性[8]、抗齲蝕作用[9]が報告されており、そして抗アレルギー作用[10]に関する機能性も報告されている。この茶の抗アレルギー作用に着目し、様々な茶品種から抗アレルギー成分の探索を行ったところ、凍頂ウーロン茶と称される品種にて、EGCG よりも強い抗アレルギー作用を示すメチル化カテキン、即ち EGCG のガレート基の 3 位がメチル化されたエピガロカテキン 3‐*O*‐メチルガレート ((–)‐epigallocatechin‐3‐*O*‐(3‐*O*‐methyl) gallate、EGCG3″Me) と 4 位がメチル化されたエピガロカテキン 4‐*O*‐メチルガレート ((–)‐epigallocatechin‐3‐*O*‐(4‐*O*‐methyl)gallate、EGCG4″Me) が確認された[11] (図

1-1)。さらに各茶品種中のメチル化カテキン含量が調査され、「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」にはEGCG3″Meが含まれていることが判明した[11][12]。しかし、そのEGCG3″Me含量は、乾燥茶葉重量当たりで約1.5%とEGCGの約10%に対して非常に微量であった。一方、日本の茶品種の約 75%を占める「やぶきた」には含まれていないことが明らかとなった[12]。

本研究の目的は、茶葉中に微量にしか含まれていないメチル化カテキンを、抗アレルギー活性を有する食品由来成分として素材化し、提供することで、環境の変化によるアレルギー性疾患改善への貢献をすることである。しかし、平成20年の「べにふうき」栽培面積は約 100ha であり(2011 年日本茶中央会資料より)、同年の茶の栽培面積4.8万ha(統計局、平成20年度作物統計調査資料) から見れば、少ないのが現状である。そのため茶葉からメチル化カテキンを抽出する場合、必要量を確保ずるのが困難であり、抽出効率も良好とは言えない。そのため、茶品種の約 75%を占める「やぶきた」など一般の茶に多く含まれているEGCGを用いて、メチル化カテキンを製造することが出来れば、非常に有効な手段となりえる。一方、食品素材として提供するためには、その製造方法も重要となってくる。製造方法の一つとして化学合成による製造もあるが、飲食品として用いるのは困難なのが現状である。そのためEGCGを基質とし、酵素変換によりメチル化カテキンを製造することとした。「べにふうき」茶にはEGCGとEGCG3″Me及びEGCG4″Meが含まれることで、抗アレルギー活性を示す。このEGCG3″MeとEGCG4″Meに加え、より優位性のあるチル化カテキンが変換できれば、相乗効果が期待でき、より効果を示す食品素材の開発も期待できる。食品素材として開発可能となれば、飲料、ゼリー、冷菓、菓子、水産・畜産加工食品、乳製品等様々な食品形態に展開可能となり、さらには栄養補助品、機能性表示食品及び特定保健用食品等への展開が可能となる。この抗アレルギー活性を有する食品素材を提供することで、花粉症患者に対するアレルギー性疾患の予防と副作用等をなくすことで生活環境の改善をすることを目的とした。



Compounds	R_1	R_2
(–)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)	H	H
(–)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)gallate (EGCG3"Me)	CH_3	H
(–)-epigallocatechin-3-*O*-(4-*O*-methyl)gallate (EGCG4"Me)	H	CH_3

図 1-1. カテキン類及びメチル化カテキンの化学構造

第２章

茶品種「べにふうき」からの新規*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の同定及びメチル化カテキンの合成

２－１．緒言

近年、カテキンの主成分である EGCG が抗アレルギー作用を有していることが報告された[13][14]。一方、各種茶葉熱水抽出物を用い、マウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制効果を指標にした抗アレルギー作用を有する茶の探索を行った結果、「べにほまれ」及び台湾系統の品種で強い効果を示した[15]。この評価系でカテキンの主要成分である EC、EGC、ECG 及び EGCG を評価したところ、その抑制効果は低かった。また抑制効果を示した茶抽出物を polyvinyl polypirrolidon (PVPP) 処理したところ、効果は弱くなった。このことから、茶ポリフェノールの主要成分以外のカテキン類がヒスタミンの遊離抑制効果に関与している可能性が示唆された。さらに抑制効果を示した茶品種から抗アレルギー成分の探索を行ったところ、凍頂ウーロン茶と称される品種から、EGCG よりも強い抗アレルギー作用を示すメチル化カテキン、EGCG3″Me と EGCG4″Me が確認された[11] (図 1-1)。各茶品種中のメチル化カテキン含量が調査され、「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」には EGCG3″Me が含まれていることが判明した[11]。また、その「べにふうき」茶葉中の部位別 EGCG3″Me の含有量を測定した結果、一芯一葉、二葉、三葉、四葉と部位が下がるにつれて高いことが判明された[16]。

これらのメチル化カテキンをマウスへ経口投与し、卵白アルブミン、アジュバンド及びアナフィラキシー反応試験によるⅠ型アレルギーに対する評価[11][17]、及びオキサゾロン誘発試験によるⅣ型アレルギーに対する評価をしたところ[18]、EGCG より強い作用を示すことが明らかとなった。さらに、その作用機作に関してもマスト細胞内情報伝達系阻害[17][15]、好塩基球の高親和性 IgE レセプター発現阻害[19]、脱顆粒抑制[20]であることが報告された。また、人に対する効果も確認されている。「べにふうき」茶飲料と「やぶきた」茶飲料を花粉飛散時期に花粉症状を有する被験者にダブルブラインドテスト下で飲用させた結果、べにふうき茶飲料で鼻かみ症状、目のかゆみ症状が有意に低減された[21]。

メチル化カテキンの吸収、体内動態に関しては、マウスへ EGCG3″Me を経口投与した試験から、60 分後の血漿中濃度は遊離体で EGCG より約 9 倍高いことが示された[22]。また、EGCG3″Me は血中からの消失も穏やかであった。ラットを用いて EGCG、EGCG3″Me 及び EGCG4″Me を投与した場合の薬物動態を調査した報告では、バイオアベイラビリティに関して EGCG3″Me は EGCG よりも 2.7 倍高く、EGCG4″Me に対しては 1.8 倍高い結果を示した[23]。一方、この報告では EGCG と EGCG4″Me のバイオアベイラビリティに顕著な差が認められなかったことから、ガロイル基の 4 位より 3 位のメチル化が重要であることを論じている。また、人での EGCG を 43.5 mg 含む茶飲料と EGCG3″Me を 8.5 mg 含む茶飲料を飲用した後の血漿中濃度を測定した結果、EGCG の AUC (area under the drug concentration time curve ; min μg/mL) は 6.72 であったのに対し、EGCG3″Me は 8.48 であった。投与量を考慮すると EGCG3″Me は EGCG に対して 5.1 倍高い血漿中濃度を示した[24]。これらの結果から、メチル化カテキンの良好な吸収性が、アレルギー抑制に対する優れた効果を示す一因であると推察される。メチル化カテキンはその良好な吸収性から、抗アレルギー作用以外にも様々な機能性が期待される有望な素材であるが、その生合成については全く解明されていない。

EGCG3″Me の生合成については、EGCG のガレート基の水酸基がメチル化されている成分であることから、メチル基を導入するメチルトランスフェラーゼにより EGCG が酵素変換されてできるものと推測される。植物のメチルトランスフェラーゼに関しては既に多くの報告があり、フラボノイドやアントシアニン等の生合成に重要な役割を果たしている。これら多くの遺伝子は既に単離されており、そのアミノ酸配列や基質特異性が明らかになっている[25][26]。一方、茶のメチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離に関する報告は、これまでにカフェイン合成系[27]やセレノシステインに関与するもののみである[28]。

本章では、「べにふうき」茶葉中から EGCG をメチル化可能なメチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離とその解析、さらには酵素変換法を用いて製造するための手掛か

りとなる情報を得ることを目的として検討を開始した。単離した遺伝子は大腸菌に組み込み、発現した酵素を用いて EGCG に対するメチル化活性の検討を行った。さらに、酵素変換法により EGCG3″Me 及び EGCG4″Me とは異なる、新規メチル化カテキンへの変換を確認したため、その構造解析を行った。

２－２．実験材料及び方法

２－２－１．試薬及び試料

実験に用いた「べにふうき」茶葉は独立行政法人野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点にて採取した、一芯一葉から四葉を使用した。High Performance Liqud Chromatography (HPLC) 分析に使用したアセトニトリル及びメタノールは HPLC 分析用のものを使用し、それ以外は特級グレードのものを使用した。また、分析に用いた標準物質は独立行政法人野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点から譲渡して頂いたものを用いた。

２－２－２．「べにふうき」からの *O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

２－２－２－１．「べにふうき」からの total-RNA 及び遺伝子断片の単離

「べにふうき」茶葉 1 g を液体窒素下で摩砕した後、RNeasy Maxi Kit (キアゲン) 及び QIAshredder (キアゲン) を用いてプロトコールに従って total RNA を抽出した。シロイヌナズナ、タバコなど代表的な植物では、既にフラボノイドやアントシアニン等の生合成に関わるメチルトランスフェラーセ遺伝子が単離されている[25][26]。そのため、これらの塩基配列を参考に相同性の高い領域を選択し、デジェネレートプライマーを設計した。Total RNA 2 μg を用い、デジェネレートプライマーを用いて Ready-to-Go-RT-PCR Beads (GE ヘルスケア) により Reverse-Transcreptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を行った。逆転写反応は 42℃,45 min、PCR は下記条件 1 にて行った。

デジェネレートプライマー配列

5’OMT：CAGTA(C/T)AT(A/T) (C/T)T(A/C/G/T)GA(A/G)AC(A/T/C)GTGT

3’OMT：TGTG(A/G)GCAAC(G/A/T)CC(A/G)GCTTT(C/T)T(G/T/C)AAT

PCR 条件 1：95℃,5 min→(95℃,1 min→55℃,1 min→72℃,1 min)×35→72℃,5 min

増幅したPCR産物は1%アガロースゲル電気泳動にかけた後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてプロトコールに従って回収し、pGEM-T ベクター (pGEM-T Vector Systems、プロメガ) へプロトコールに従ってクローニング後、大腸菌JM109株 (タカラバイオ) へ常法に従って形質転換した。得られたプラスミドを含む大腸菌をLB培地で37℃、160 rpmにて約16時間振とう培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン) を用いてプラスミドを抽出した後、塩基配列を確認した。塩基配列の確認にはBig Dye Terminator Cycle Kit ver.3.1 (アプライド バイオシステムズ) を用いてプロトコールに従ってPCRを行ない、塩基配列の解析にはシークエンサー：3100-Avant Genetic Analyzer (アプライド バイオシステムズ) を用いた。

２－２－２－２．RACE-PCR法による5'側遺伝子の単離

塩基配列の解析で得られた配列情報をもとにし、RACE-PCR法 (Rapid Amplification of cDNA ends) による5'側cDNAの単離を行った。RACE-PCRは5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (ライフ テクノロジーズ) を使用し、プロトコールに従って行なった。Total RNA 5 μg及びプライマー5'GSP1を用いてファーストストランドcDNAを合成し、次にプライマー5'GSP2を用いてPCRを行った (PCR条件2)。得られたPCR産物2 μLを鋳型とし、プライマー5'GSP3を用いてPCRを行った (PCR条件3)。増幅したPCR産物は1%アガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルから回収し、pGEM-Tベクターへクローニング後、大腸菌JM109株へ形質転換して同様に塩基配列を確認した。

プライマー配列

5'GSP1：TTCGAAGTTTTCTCTGTTAATGTC

5'GSP2：GTGGCGAGAAGAGAGTAACAA

5'GSP3：CGGCAGAAGGTAGTCATGATGT

PCR 条件 2：94℃,5 min→(94℃,1 min→55℃,1 min→72℃,75sec)×35→72℃,10 min

PCR 条件 3：94℃,5 min→(94℃,1 min→60℃,1 min→72℃,75sec)×35→72℃,10 min

２－２－２－３．RACE-PCR 法による 3’側遺伝子の単離

塩基配列の解析で得られた配列情報をもとにし、RACE-PCR 法による 3’側 cDNA の単離を行った。RACE-PCR は 3’RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (ライフ テクノロジー) を使用した。Total RNA 5 μg 及びキットに付属のアダプタープライマーを用いてファーストストランド cDNA を合成し、次にプライマー3’GSP1 を用いて PCR を行った (PCR 条件 4)。増幅した PCR 産物は 1%アガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルから回収し、pGEM-T ベクターへクローニング後、大腸菌 JM109 株へ形質転換して同様に塩基配列を確認した。

プライマー配列

3’GSP1：GAGACCAGTGTTTACCCAAGAGAG

PCR 条件 4：94℃,5 min→(94℃,1 min→62℃,1 min→72℃,90sec)×35→72℃,10 min

２－２－２－４．全塩基配列の決定

単離した遺伝子の ORF (Open Reading Frame) 領域の塩基配列の決定を試みた。なお使用するベクター及び大腸菌は、この後の組換え酵素の発現を念頭にしたものを使用した。

5’末端配列特異的なプライマーCsOMT-5’*Nde*Ⅰ、3’末端配列特異的なプライマーCsOMT-3’*Bam*HⅠ及び 3’RACE-PCR の際に合成したファーストストランド cDNA を用

い、PCR を行った (PCR 条件 5)。ポリメラーゼは KOD-Plus-DNA Polymerase (東洋紡) を用いた。増幅した PCR 産物及び pET28a (+) 発現ベクター (メルク KGaA) を *Nde*Ⅰ、*Bam*HⅠ処理した後、それぞれ 1%アガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルから回収し精製した。精製した DNA 断片を DNA Ligation Kit ver.2.1 (タカラバイオ) を用いて pET28a (+) 発現ベクターに遺伝子断片を挿入後、大腸菌 BL21 (DE3) 株 (ストラタジーン) へ形質転換した。遺伝子が導入された大腸菌を培養し、プラスミドを抽出した後、同様に塩基配列を確認した。

プライマー配列

CsOMT-5'NdeⅠ ：TTAGCTC*CATATG*GCAACAAACGGAGAAGGAGA

(イタリック体：*Nde*Ⅰサイト、下線部：ORF 5'末端配列)

CsOMT-3'BamHⅠ：TTAGCT*GGATCC*TCAGCAGACACGCCGGCA

(イタリック体：*Bam*HⅠサイト、下線部：ORF 3'末端配列)

PCR 条件 5：94℃,2 min→(94℃,15sec→60℃,30sec→68℃,1 min)×35→68℃,5 min

２－２－３．大腸菌を用いた組換え酵素の発現

先の２－２－２．で作製した ORF 領域を組み込んだ pET28a (+) ベクターを保持する大腸菌 BL21 (DE3) を LB 培地にて 37℃、160 rpm で約 16 時間培養した。培養液の一部を新しい LB 培地 10 mL に植菌し、37℃、160 rpm で $O.D_{600}$=0.6 になるまで培養した。その後 IPTG (isopropylthiogaractoside) を最終濃度 0.1 M になるように加え、28℃、160 rpm で 5 時間振とう培養した。遠心分離により得られた沈殿物を 20 mM リン酸 buffer (pH7.4) に懸濁した後、超音波破砕した。再度遠心分離により回収した上清を組換え酵素液とした。酵素液の一部は 12%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) で電気泳動し、Coomassie brilliant blue にて染色した後、発現した酵素の確

認を行った。さらに発現した酵素はHis-tagカラム (HisTrap Column Kit、GEヘルスケア) を用いて酵素の単離、精製を行った。

２－２－４．酵素活性及び生成物の分析

得られた組換え酵素を用いて、酵素活性を確認した。酵素反応には100 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.2 mM $MgCl_2$, 25 μM EGCG, メチル基供与体として0.4 mM S-アデノシル-L-メチオニン (S-adenosyl-L-methionine、SAM) を用い、酵素液1 mLを添加した。全量5 mLの酵素反応液は30℃で1時間反応させた。その後1 M HClを70 μL加えて酵素反応を停止させ、酢酸エチル8mLを加えて振とうし、遠心分離後の有機層を回収した。得られた有機層を窒素ガスを用いて濃縮乾固し、1% アスコルビン酸ナトリウムを含む30% (v/v) メタノール溶液に溶解して分析を行なった。

HPLCは㈱島津製作所製LC-10Aシステムを使用し、UV検出器にて波長272 nmで分析し、さらにPDA (フォトダイオードアレイ) 検出器を用いて分析した。カラムは逆相カラムWakopak Navi C18-5、4.6×150 mm (和光純薬) とガードカラムWakopak Navi C18-5、4.6×10 mm (和光純薬) を用い、カラム温度は40℃に設定した。移動相はA液；水、アセトニトリル、リン酸を400：10：1 (v/v) で混合したものと、B液；メタノール、A液を2：1 (v/v) で混合したものを用い、高圧グラジェントの条件で分析を行った。初めに80%A液を2分間維持し、その後25分で20%A液にした。20%A液で18分間維持し、その後10分で80%A液に戻して分析を行った。流速は1 mL/minで行なった。

２－２－５．新規メチル化カテキンの構造解析

酵素反応にて確認された未知の生成物ピークの単離、同定を行うために、酵素反応のスケールアップを行った。100 mM Tris-HCl (pH7.4), 0.2 mM $MgCl_2$にEGCG 400 mg, 0.4 mM SAM、組換え酵素液100 mLを添加し、全量を1.5 Lとした。30℃で一晩反応させた後、6 N HClを10 mL添加した。酵素反応液を55℃で余分なタンパク質の沈殿物が出

るまで保温し、遠心分離した上清を約1/10量まで減圧濃縮した。等量の酢酸エチルを加えて振とうし、遠心分離後の有機層を回収した。得られた有機層を減圧濃縮にて乾固し、適量の1% アスコルビン酸ナトリウムを含む30% (v/v) メタノール溶液に溶解した。得られた溶解液をHPLCに注入し、必要とするピーク画分を分取した。HPLCは㈱日立製作所製 (Hitachi HPLC system、L-7150 pump、L-7420 UV-vis Detector、D-2500 chromato-integrator) を使用し、UV検出器にて波長280 nmで分析を行った。カラムは逆相カラムInertsil ODS-Ⅲ, 20×150 mm (GL Science Inc., Tokyo) を用い、カラム温度は室温で行った。移動相は35 (v/v) %メタノールを用い、流速12 mL/minで行った。

LC-TOF-MS (QSTAR Elite, Applied Biosystems, Inc., CA) の分析には、Analyst QS 2.0 software (アプライド　バイオシステムズ) を用いた。イオン源の温度を450℃、分子量の測定範囲をm/z 100-1000 とした。イオン化の条件は、ion spray voltage,-4500 V; auxiliary gas, 50 psi; nebulizer gas, 50 psi; nitrogen curtain gas, 30 psi; declustering potential, -30 V; focusing potential, -250 V; declustering potential 2, -15 V; accumulation time, 1 秒とした。UV スペクトルは㈱日立製作所製 (U-2000 spectrophotometer) を用いた。

NMR 測定には XWIN-NMR AV 600 (Bruker Biospin) を用い、各種 NMR スペクトル (^{1}H-NMR (600 MHz)、^{13}C-NMR (150 MHz)、HSQC、HMBC、COSY) を測定した (^{1}H は TMS を、^{13}C は溶媒シグナルを基準にした)。分取したピーク画分溶液は減圧濃縮し、凍結乾燥後 CD_3OD に溶解した。

２－３．結果

２－３－１．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

デジェネレートプライマーを用いた RT-PCR の結果、約 300bp の遺伝子断片を得ることができた。塩基配列のホモロジー検索を National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースを用いて行なった結果、他植物で既知のカフェオイル CoA *O*－メチルトランスフェラーゼ (Caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase、CCoAOMT) である *Vitis vinifera*[29]、*Petroselinum crispum*[30]及び *Nicotiana tabacum*[31]と高い相同性を示した。そのため更に RACE-PCR 法によりオープンリーディングフレーム (ORF) を含む 5’末端非翻訳領域および 3’末端非翻訳領域をカバーした遺伝子全長を単離した。単離した遺伝子の塩基配列を解析した結果、1094 塩基であり、735 塩基からなる ORF をコードしていた (図 2-1)。推定されるアミノ酸配列は 245 残基であった。塩基配列及びアミノ酸配列の相同性検索を NCBI データベースを用いてホモロジー検索を行なった結果、他植物で既知の CCoAOMT である *Vitis vinifera* (GeneBank accession no.*Z*54233)[29]、*Petroselinum crispum* (no.M69184)[26]及び *Nicotiana tabacum* (no.U62735.1)[31]と塩基配列で約 80%、アミノ酸配列で 90%前後を示し、SAM 結合ドメイン (A,B 及び C ドメイン) を三箇所保持していることも判明した[32](図 2-2)。以上の結果から、単離した遺伝子はメチルトランスフェラーゼ活性を有する酵素をコードしていると推察され、*CsOMT* (*Camellia sinensis O*-methyltransferase) と命名した。

ctctctctgc tcaccggcga tccaacactc cggcgaaaca aaaccaaaga ggaaaaaaca 60

cagaaaatta attcgctgca ata atg gca aca aac gga gaa gga gaa cag aat 113

Met Ala Thr Asn Gly Glu Gly Glu Gln Asn

1 5 10

ctc agg cac caa gag gtc ggc cac aag agt ctt tta cag agc gat gct 161

Leu Arg His Gln Glu Val Gly His Lys Ser Leu Leu Gln Ser Asp Ala

15 20 25

ctc tac cag tat ata ctt gag acc agt gtt tac cca aga gag cca gag 209

Leu Tyr Gln Tyr Ile Leu Glu Thr Ser Val Tyr Pro Arg Glu Pro Glu

30 35 40

gcg atg aag gag ctc aga gag gtc act gca aaa cat cca tgg aac atc 257

Ala Met Lys Glu Leu Arg Glu Val Thr Ala Lys His Pro Trp Asn Ile

45 50 55

atg act acc tct gcc gac gaa ggt cag ttc ttg aac atg ctt ttg aag 305

Met Thr Thr Ser Ala Asp Glu Gly Gln Phe Leu Asn Met Leu Leu Lys

60 65 70

ctt atc aac gcc aag aac acg atg gaa atc ggt gtt tac act ggt tac 353

Leu Ile Asn Ala Lys Asn Thr Met Glu Ile Gly Val Tyr Thr Gly Tyr

75 80 85 90

tct ctt ctc gcc acc gcc ctt gct ctc ccc gat gat ggg aag att ttg 401

Ser Leu Leu Ala Thr Ala Leu Ala Leu Pro Asp Asp Gly Lys Ile Leu

95 100 105

gca atg gac att aac aga gaa aac ttc gaa atc ggt ctg ccg ata att 449

Ala Met Asp Ile Asn Arg Glu Asn Phe Glu Ile Gly Leu Pro Ile Ile

110 115 120

gaa aag gcc ggc gtc gct cac aaa atc gac ttc aga gaa ggc cct gct 497

Glu Lys Ala Gly Val Ala His Lys Ile Asp Phe Arg Glu Gly Pro Ala

125 130 135

ctg cct gct ctc gat aaa atg gtc gaa gat gga aag cat cat ggg tcg 545

Leu Pro Ala Leu Asp Lys Met Val Glu Asp Gly Lys His His Gly Ser

140 145 150

ttt gat ttc att ttc gtg gac gct gac aag gac aac tac atc aac tac 593

Phe Asp Phe Ile Phe Val Asp Ala Asp Lys Asp Asn Tyr Ile Asn Tyr

155 160 165 170

cac aag agg ctg att gat ctg gtg aag gtt ggg gga ctg atc ggc tac 641

His Lys Arg Leu Ile Asp Leu Val Lys Val Gly Gly Leu Ile Gly Tyr

175 180 185

gat aac acc ctc tgg aac ggc tct gtg gtg gcg cct ccg gac gct ccg 689

Asp Asn Thr Leu Trp Asn Gly Ser Val Val Ala Pro Pro Asp Ala Pro

190 195 200

atg agg aag tac gta agg tac tac aga gac ttc gtc ttg gag ctc aac 737

Met Arg Lys Tyr Val Arg Tyr Tyr Arg Asp Phe Val Leu Glu Leu Asn

205 210 215

aag gca ctc gcc gcc gat ccc cgc atc gag atc tgc atg ctt cct gtc 785

Lys Ala Leu Ala Ala Asp Pro Arg Ile Glu Ile Cys Met Leu Pro Val

220 225 230

ggc gat ggc att acc ctg tgc cgg cgt gtc tgc tgattccaac ccattgctgg 838

Gly Asp Gly Ile Thr Leu Cys Arg Arg Val Cys

235 240 245

acaaaaacca aataatatga tattttgctt ttatttttat tatcttttgt tatgtcatat 898

gtatttgtat ttctaatgga cggtggatga ttggaagagt tcacgaccta cgcttccgat 958

ttgatttgct gctcgaatca acatacaaag tggtctatta attggttttg aaatattagt 1018

aatgttgttc atgcaatatt tttataaata tcaattcata attgaaaata tggggaaaaa 1078

aaaaaaaaaa aaaaaa 1094

図 2-1. *CsOMT* の全塩基配列及び推定アミノ酸残基



図 2-2. CsOMT と *N.tobacum*、*P.crispum* 及び *V.vinifera* の CCoAOMT とのアミノ酸配列の比較

一致したアミノ酸配列は白字で示した。CCoAOMT の SAM 結合領域として提案されている 177-186、196-206 及び 220-230 番目は、CsOMT と比較しても高い保存性を示した。

２－３－２．大腸菌を用いた組換え酵素の発現

単離した *CsOMT* を pET28a (＋) 発現ベクターに挿入し、大腸菌 BL21 (DE3) 株へ形質転換した。また、CsOMT の 5’末端にはベクター由来のヒスチジン配列を連結させた。得られた大腸菌を培養し、IPTG の添加により発現した酵素を抽出し、12% SDS-PAGE で電気泳動した。その結果、IPTG を添加していないコントロールと比較して分子量約 27.6 kDa の位置に特異的なバンドを確認することができた。得られたバンドのサイズは CsOMT のアミノ酸配列から推定される分子量とも一致した (図 2-3)。

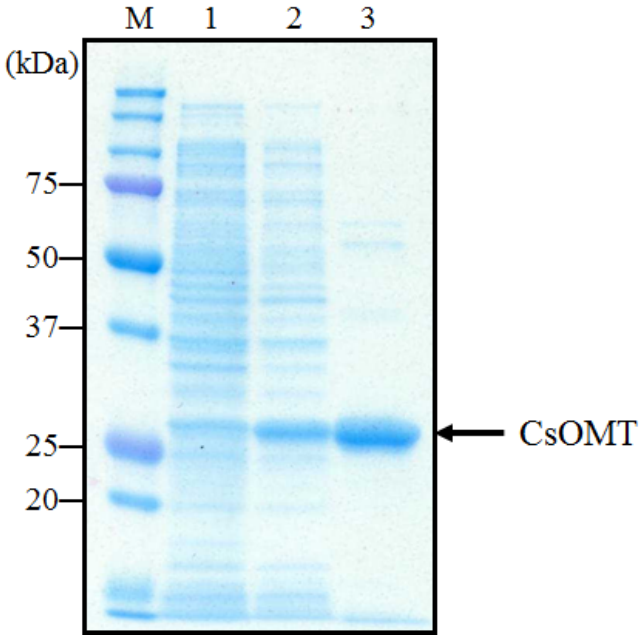


図 2-3．大腸菌で発現させた CsOMT 酵素の 12%SDS-PAGE 電気泳動像

M：分子量マーカー、レーン 1：IPTG で誘導していない場合の大腸菌の粗酵素、レーン 2：IPTG で誘導をかけた場合の大腸菌の粗酵素、レーン 3：IPTG で誘導し、His-tag カラムで精製した場合の酵素

２－３－３．酵素活性及び生成物の分析

大腸菌で発現させた CsOMT 酵素を EGCG と反応させ、得られた生成物を HPLC で分析した。その結果、EGCG3″Me 及び EGCG4″Me の生成が確認された (図 2-4)。これらのメチル化カテキンは酵素の添加量に依存して生成量が増加することが確認された。また、リテンションタイム 34 min と 42 min 付近にカテキンと同じ 270～280 nm の極大吸収を示す未知の反応生成物のピーク Compound A (C-A)、Compound B (C-B) が確認された。

次に得られたメチル化カテキンが CsOMT 酵素由来であることを確認するために、以下の検討を行った。

①IPTG にて発現誘導をかけていない大腸菌を用いた場合
②ベクターのみを導入した大腸菌を用いた場合
③大腸菌により発現誘導させた酵素を熱処理した場合
④大腸菌により発現誘導させた酵素を用い、反応液中に EGCG あるいは SAM を添加しなかった場合

その結果、いずれの場合もメチル化カテキンの生成は確認されなかった。

さらに発現した CsOMT 酵素は His-tag カラムを用いて酵素の単離、精製を行ない、EGCG と反応させたところ、各メチル化カテキンの生成を確認することができた。以上のことから、これらのメチル化カテキンは今回単離した CsOMT 由来の酵素反応によって変換されたものであることが確認された。

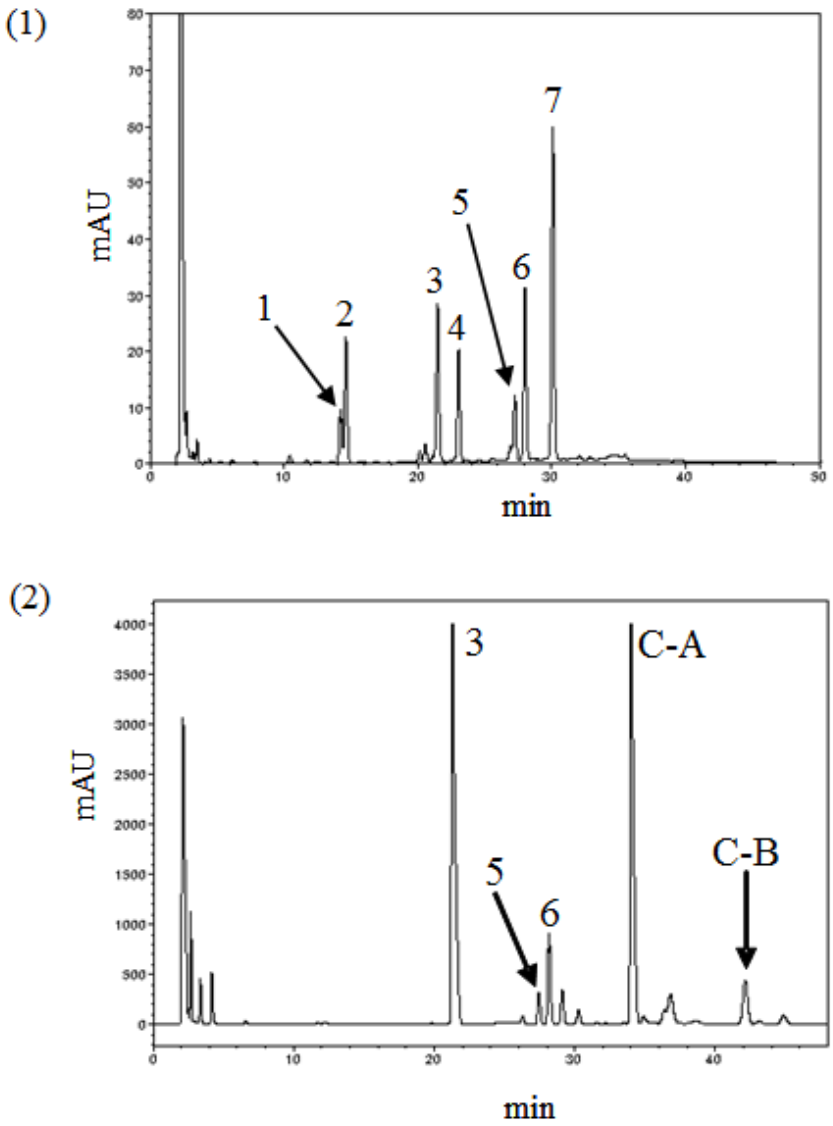


図 2-4. CsOMT を用いた酵素反応後の HPLC クロマトグラム

(1) 標準物質ピーク、ピーク 1：ECG、ピーク 2：カテキン、ピーク 3：EGCG、ピーク 4：EC、ピーク 5：EGCG4″Me、ピーク 6：EGCG3″Me、ピーク 7：ECG。(2) 酵素反応産物、2 種類の未確認物質のピーク Compound-A (C-A) と Compound-B (C-B) が検出された。

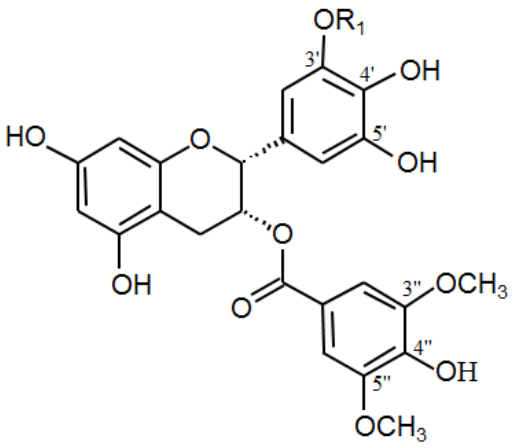
２－３－４．新規メチル化カテキンの構想決定

HPLC 分析の結果、EGCG3″Me 及び EGCG4″Me とは異なる新たな未知ピーク C-A と C-B が確認できた。これらのピークの極大吸収を確認したところ、カテキンと同じ蛍光波長 270～280 nm 付近を示した。また EGCG3″Me のピークよりも遅く溶出したことから、さらに多くのメチル基が修飾した脂溶性の高い物質であると考えられた。そのため、これらのピークを単離、同定するために酵素反応のスケールアップを行い、構造解析を試みた。

単離した未知ピーク C-A の構造解析を行なった結果、LC-TOF-MS (*m/z* 485.1094[M-H$^-$], calcd for 485.1078) や ^{13}C NMR スペクトルの値から $C_{24}H_{22}O_{11}$ であることが判明した。これらの結果から、本化合物はエピガロカテキン-3-*O*-(3,5-*O*-ジメチル)ガレート ((–)-3′-*O*-methylepigallocatechin－3－*O*－(3,5－*O*－dimethyl)gallate 、EGCG3″,5″diMe)であることが判明した (表 2-1、図 2-5)。EGCG3″,5″diMe は既に単離報告があり、その NMR データと照らし合わせ、一致した[33]。

未知ピーク C-B についても同様に解析を試みた。分子式は、LC-TOF-MS (*m/z* 499.1242 [M-H]$^-$, calcd for 499.1234) や ^{13}C NMR スペクトルの値から $C_{25}H_{24}O_{11}$ と決定した。分子式から未知ピーク C-B は EGCG に 3 つのメチル基が導入されている化合物であることが示唆された。化合物 C-B の NMR スペクトルは EGCG3″,5″diMe と大部分が類似していたものの、メトキシシグナル (δ 3.62, 3H, s) が 1 つ増加し、H-2'と H-6'が等価のシングレットシグナル (δ 6.53 (2H, s) in EGCG3″, 5″diMe) から非等価のダブレットシグナル (δ 6.58 (H-2', 1H, d, *J* = 1.5 Hz), δ 6.65 (H-6', 1H, d, *J* = 1.5 Hz) in compoundC-B) に変化していた。HMBC スペクトル解析の結果、δ 3.62 のメトキシシグナルは C-3'と、H-2'は C-1', C-3', C-4', C-6', C-2 と、H-6'は C-2', C-4', C-5', C-2 との相関が確認された。これらの結果、新たに増えたメトキシシグナルは B 環の C-3'に結合していることが示唆された。すなわち、化合物 C-B は 3- *O* -メチルエピガロカテキン-3- *O*-(3,5- *O*－ジメチル)ガレート ((–)－3′-*O*-methylepigallocatechin－3－*O*－(3,5－*O*－dimethyl)gallate 、 EGCG3′,3″,5″triMe)

であると決定した (表 2-1、図 2-5)。本化合物はこれまでに単離報告のない、新規であることが判明した。



Compounds	R_1
(–)- epigallocatechin - 3 - *O* - (3,5 - *O* - dimethyl) gallate (EGCG3'',5''diMe)	H
(–)- 3'-*O*-methyepilgallocatechin - 3 - *O* - (3,5 - *O* - dimethyl) gallate (EGCG 3',3'',5''triMe)	CH_3

図 2-5. EGCG3″, 5″diMe と EGCG3′,3″,5″triMe の化学構造

表 2-1.　構造物 C-A 及び C-B の ^{13}C-及び ^{1}H-NMR スペクトル

重メタノール CD_3OD (150 MHz for ^{13}C, 600 MHz for ^{1}H)[a] を用いて測定

Position		compound-A	Position		compound-B
	δC	δH		δC	δH
2	78.4	5.04 (br s)	2	78.8	5.07 (br s)
3	70.8	5.47 (m)	3	70.6	5.55 (m)
4	26.3	2.92 (dd = 3.6, 17.4)	4	26.7	2.92 (dd = 3.0, 17.4)
		3.00 (dd = 4.8, 17.4)			3.03 (dd = 4.8, 17.4)
5	157.8[a]		5	157.9[b]	
6	96.3	5.98 (d = 2.4)	6	95.7	6.00 (d = 2.4)
7	158.0[a]		7	158.1[b]	
8	96.5	5.96 (d = 2.4)	8	96.6	5.98 (d = 2.4)
9	157.1		9	157.3	
10	99.3		10	99.4	
1'	131.0		1'	130.7	
2', 6'	106.7	6.53 (s)	2'	103.2	6.58 (d = 1.5)
3', 5'	146.9		3'	149.4	
4'	133.7		4'	134.9	
1"	121.6		5'	146.4	
2", 6"	108.2	7.15 (s)	6'	108.7	6.65 (d = 1.5)
3", 5"	148.8		OMe	56.5	3.62 (s)
4"	141.8		1"	121.5	
OMe	56.8	3.82 (s)	2", 6"	108.3	7.17 (s)
C=O	167.6		3", 5"	148.9	
			4"	142.2	
			OMe	56.8	3.81 (s)
			C=O	167.3	

*[ab] 各シグナルは、同一カラムで互換性を示した

２－４．考察

本研究で、茶から EGCG にメチル基を修飾できる *O*－メチルトランスフェラーゼ、*CsOMT* を単離した。*CsOMT* は 1094 塩基であり、738 塩基からなる ORF をコードしてた。推定されるアミノ酸配列は 245 残基であった。茶のメチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離に関する報告は、これまでにカフェイン合成系やセレノシステインに関与するもののみであり、それぞれのアミノ酸配列は 369 及び 351 残基からなっている[27][28]。そのため CsOMT とはアミノ酸配列数が異なり、別のクラスの *O*－メチルトランスフェラーゼであることが推察された。塩基配列及びアミノ酸配列の相同性検索を NCBI データベースを用いてホモロジー検索を行なった結果、他の植物で既知の CCoAOMT と塩基配列で約 80%、アミノ酸配列で 89%前後を示めしたころから、本酵素は CCoAOMT のクラスに分類されることが判明した。植物の CCoAOMT は 232-248 アミノ酸残基からなるクラスⅠと 344-383 アミノ酸残基からなるクラスⅡに分類される[32]。そのため、CsOMT はクラスⅠに分類される茶から初めて単離された酵素であった。CCoAOMT はリグニンの生合成に関与する遺伝子である。リグニンは繊維細胞や木部導管などの二次細胞壁に存在しており、樹木の保護物質としての役割を果たしているだけでなく、病害虫に対する防御機能の役割も果たしている[34]。タバコ (*Nicotiana tanacum*) の CCoAOMT 発現量を人為的に減少させた形質転換体では、リグニン含量が減少することも判明している[35]。CCoAOMT はカフェオイル CoA と 5-ヒドロキシフェロイル CoA を認識してメチル基を導入し、それぞれフェロイル CoA とシナポイル CoA へ変換する[35][36]。また CCoAOMT はアミノ酸レベルでカテコール *O*－メチルトランスフェラーゼと高い相同性を示す。細胞性のカテコール *O*－メチルトランスフェラーゼは EGCG を認識し、EGCG4″Me 又は EGCG4′,4″diMe へと変換した[37]。これらの報告からも、CsOMT は EGCG を認識できたことが推察される。また、CsOMT の茶葉の異なる部位での発現レベルをリアルタイム-PCR を用いて測定し、その発現量と EGCG3″Me の含量との相関を調査した報告がある[38]。その結果では、一芯一葉、二葉、三葉、四葉と部位が下が

るにつれて EGCG3″Me 含量が増加し、CsOMT の発現レベルも相関して高まっていることが判明した。このとから、CsOMT は EGCG3″Me の生合成に関与していると結論づけている。

CsOMT は EGCG を基質とした酵素変換の結果、既知の EGCG3″Me と EGCG4″Me 以外に EGCG3″,5″diMe と EGCG3′,3″,5″triMe へ変換した。EGCG3″,5″diMe は薬用植物である西アフリカ産の *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken[39] とブラジル産の *Stryphnodendron adstringens* (Martiuc) coville[33]から単離された報告があるものの、その含量は非常に少なく、また茶からの単離報告はこれまでに無い。EGCG3′,3″,5″triMe に関しては単離報告が無く、新規物質であった。

以上の結果から、「べにふうき」から EGCG を基質としてメチル化カテキンへ変換できる新規 *O*－メチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子 *CsOMT* を単離することできた。

第３章

「エノキタケ」からの新規*O*－メチルトランスフェラーゼの探索、同定及び新規メチル化カテキンの合成

３－１．緒言

近年、日本を含む先進国において、生活環境の変化や食生活の変化による様々な生活習慣病の患者が増加している。これらの症状を有する患者やその予備軍にとって、その改善を試みる手段の一つに健康食品や特定保健用食品等の機能性食品の摂取が挙げられる。中でも植物の果実や葉等から抽出されたポリフェノールを有効成分とするものが多く開発されている。これらのポリフェノールはその構造に複数のフェノール性水酸基を持つことが特徴であり、本研究第２章の緒言でもふれたように様々な機能性が研究、報告されている。これらの機能性を期待し、植物から抽出・精製された、多種多様なポリフェノールが食品用素材として用いられ、その効果が期待されているが、必ずしもポリフェノール自体の生体内への吸収性が良好とは言えない。ヒトへのポリフェノール摂取後の吸収性を比較した結果でも、最高血漿中濃度で数 μmol/L の濃度であったことが報告されている[40][41]。

近年、茶ポリフェノールの主要成分である EGCG に関してもこれらの機能性に関する様々な報告がなされている。さらに、茶品種「べにふうき」から EGCG のメチル化体である EGCG3″Me と EGCG4″Me が単離、精製され、EGCG よりも強い抗アレルギー作用を有していることが報告された[11]。本研究第２章では、「べにふうき」からこの EGCG にメチル基を修飾する *O*－メチルトランスフェラーゼ酵素、*CsOMT* の遺伝子単離に成功した。大腸菌を用いて発現させた CsOMT を EGCG と反応させた結果、EGCG3″Me と EGCG4″Me 以外に、新たに EGCG3″,5″diMe、EGCG3′,3″,5″triMe の生成を確認した。

化合物の水酸基をメチル化する方法としては、化学合成によるものがあるが、飲食品として用いるのは困難なのが現状である。また、酵素法を用いたメチル化体の製造方法がある。例えばラット、豚や牛の肝臓から抽出したカテコール‐*O*‐メチルトランスフェラーゼの酵素が試薬品として市販されており、これらを用いたメチル化体の製造方法がある。しかし飲食品への展開を考えた場合、これらの酵素を大量製造するの

は困難であり、かつ動物由来の酵素を用いることは感染症等の問題が懸念されることから考えても使用するのは難しいと言える。他に植物体由来のメチルトランスフェラーゼ酵素を効率的に生産する方法として、その酵素遺伝子を単離し、大腸菌等の微生物を用いて発現させる方法もあるが、飲食品として用いるのは困難である。また植物体から酵素を精製する可能性もあるが、大量栽培が必要であり、カルス培養という方法もあるが、工業生産等を考えると現実的でない。これらの事から食品素材への使用が可能であり、消費者が受け入れやく、かつ工業生産を考えた場合の大量製造可能なメチルトランスフェラーゼ酵素を探索することとした。

第２章で茶から単離した CsOMT は CCoAOMT と高い相同性を示した。CCoAOMT は植物のリグニン生合成経路に関与する重要な酵素である。この結果を念頭に文献の調査を行なったところ、担子菌である *Phanerochaete chrysosporium* にリグニンを分解する過程で酸化反応、還元反応、そしてメチル化反応があることが判明した[42][43]。また、*P. chrysosporium* から単離、精製された *O*-メチルトランスフェラーゼはアセトバニロンやバニリン酸等の化合物をメチル化したという報告がある[44]。そのため担子菌にもリグニンを認識してメチル化することのできる CCoAOMT と同様の酵素が存在する可能性も考えられた。担子菌には白色腐朽菌が含まれており、一般に我々が食用として利用しているキノコもその中に含まれている。キノコの菌糸体は液体培養が可能であり、実際、その菌糸体培養物が健康食品として販売されている。このことは食経験のある微生物由来の酵素であり、かつ工業的な大量培養が可能であることから、将来の食品素材への応用も念頭に入れた場合、極めて重要な酵素となりうる。

これらのことから本章では食経験のあるキノコから CCoAOMT 様活性を示す新規メチルトランスフェラーゼ酵素の探索を行い、その酵素精製及びアミノ酸配列を解析した。さらに内部アミノ酸配列情報をもとに遺伝子の単離とその解析を試みた。単離した酵素遺伝子を大腸菌に組み込み、発現した酵素を用いて EGCG と反応させ、得られたメチル化体の解析及び酵素の性質を解析した。得られた酵素を用いて様々なポリフ

ェノールを基質として反応させ、メチル基導入の有無及びその基質特異性を評価した。

３－２．実験材料及び方法

３－２－１．試薬及び試料

HPLC 分析に使用したアセトニトリル及びメタノールは HPLC 分析用のものを使用し、それ以外は特級グレードのものを使用した。EGCG3″Me、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe は第２章にて単離、精製したものを使用した。他のポリフェノール化合物はフナコシ株式会社から購入した。スクリーニングに使用した食用キノコはスーパーマーケットで購入した国産ものを使用した。

３－２－２．各種「キノコ」からの菌糸の単離及び培養

菌糸の単離は子実体の柄の部分をカットし、0.5%次亜塩素酸に 15 分間浸した後、滅菌水で洗浄した。柄の内部から 5 mm 程度を切り出し、Difco Potato Dextrose Ager 培地上で 25℃にて培養し、菌糸体を単離した。得られた菌糸体を 0.02% glucose, 0.01% peptone, 0.002% Yeast Extract, 0.002% KH_2PO_4, 0.001% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ の液体培地に接種し、28℃にて旋回培養した。食用キノコからの菌糸体単離は *Lentinus edodes* (シイタケ), *Lyophyllum shimeji* (シメジ), *Grifola frondosa* (マイタケ), *Flammulina velutipes* (エノキタケ), *Hypsizygus marmoreus* (ブナシメジ), *Pleurotus ostreatus* (ヒラタケ), *Armillaria mellea* subsp. *Nipponica* (ナラタケ), *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* (タモギタケ), *Pleurotus eryngii* (エリンギ) 及び *Pleurotus nebrodensis* (アワビタケ) を用いた。

３－２－３．*O*－メチルトランスフェラーゼ活性の探索

得られた菌糸体培養液をろ過して菌糸体を回収し、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10% glycerol 溶液を加えて超音波破砕した後、遠心分離した上清を粗酵素液として酵素活性の測定に用いた。活性測定の基質には EGCG を用い、そのメチル化体の生成を指標とした。酵素反応組成は 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM EGCG, 0.5 mM SAM, 粗酵素液 1.5

mL とし、全量 3 mL で 37℃、16 時間反応させた。酵素反応液に 1 M HCl 70 μL、酢酸エチル 5 mL を加えて攪拌し、遠心分離して有機層を回収した。有機層を窒素で乾固した後、1%アスコルビン酸を含む 30% (v/v) メタノール溶液に溶解し HPLC 又は LC-TOF-MS を用いて測定した。HPLC 及び LC-TOF-MS の測定条件は第２章「２－２－４」及び「２－２－５」と同様に行なった。

３－２－４．*O*－メチルトランスフェラーゼの精製

菌糸体を液体培養し、得られた菌糸体培養液をろ過して菌糸体を回収して凍結乾燥した。酵素活性は凍結乾燥しても失活しないことを事前に確認した。凍結乾燥物約 12 g を乳鉢で破砕した後、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol 溶液 600 mL に懸濁した。超音波破砕し、遠心分離 (10,000 rpm×10 min, 4℃) した上清を再度遠心分離 (30,000 rpm×30 min, 4℃) して上清を回収した。上清に 60%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、攪拌、遠心分離した。遠心上清に 80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、攪拌、遠心分離して沈殿物を得た。沈殿物を 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol 溶液 40 mL に溶解した後、PD-10 カラム (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を用いて脱塩した。脱塩したサンプルは 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT 緩衝液で平衡化した陰イオン交換カラム (HiPrep 16/10 DEAE FF、GE ヘルスケアジャパン) に吸着させ、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT を含む 0-500 mM NaCl 溶液の直線濃度勾配を用いて 2 mL/min の流速で溶出し、活性画分を分取した。活性の確認は実験方法「３－２－３」に従って HPLC で確認した。活性画分を分画分子量 3,000 の限外ろ過カラムで脱塩、濃縮した後、1.5 M の硫酸アンモニウム濃度になるように調製した。サンプルは 100 mM リン酸バッファー (pH7.5), 1 mM DTT, 1.5 M 硫酸アンモニウム緩衝液で平衡化した疎水性相互作用カラム (Phenyl Sepharose HP Hiload 26/10、GE ヘルスケアジャパン) に吸着させ、100 mM リン酸バッファー (pH7.5), 1 mM DTT を含む 1.5-0 M 硫酸アンモニウムの直線濃度勾配を用いて 2

mL/min の流速で溶出し、活性画分を分取した。活性画分は同様に脱塩、濃縮した後、一部を 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT 緩衝液で平衡化した強陰イオン交換カラム (TSK-gel BioAssist Q, 4.6 mm i.d.×5 cm、東ソー㈱) に吸着させた。20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT を含む 0-500 mM NaCl 溶液の直線濃度勾配を用いて 1 mL/min の流速で溶出し、活性画分を分取した。活性画分を同様に脱塩、濃縮した。

３－２－５．SDS-PAGE、二次元電気泳動による *O*－メチルトランスフェラーゼの精製及びトリプシン処理

疎水性相互作用カラム精製で得られた活性画分を Protein Desalting Spin Columns (サーモサイエンティフィックスジャパン) を用いて脱塩し、10 mM Tris-HCl (pH7.5) にて溶出した。サンプルの一部は 12% SDS-PAGE にアプライし、得られたバンドをゲルより抽出した。次いで同サンプルのうち、タンパク質 20 μg を減圧乾固し、膨潤用 buffer (9 M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 0.5% Immobilized pH gradient buffer, 0.002% bromophenol blue) 125 μL に溶解した。遠心分離した上清 120 μL を Immobiline Dry Strip (pH3-10, 7 cm、GE ヘルスケアジャパン) に供試した。Immobiline Dry Strip は Ettan IPGphor3 IEF System (GE ヘルスケアジャパン) を用いて等電点電気泳動を行なった。膨潤液は 9 M Urea, 2% (w/v) CHAPS, 0.5% (v/v) ampholyte (pH3-10), 0.002% bromophenol blue1 を用い、500V-1h, 1000V-1h, 8000V-2h, 8000V-12h の条件で行なった。等電点電気泳動終了後、Immobiline Dry Strip を平衡化 buffer A (1 M Tris-HCl (pH8.8) 5 mL, Urea 36.03 g, Glycerol 30 g, SDS 2 g, DTT 1 g / 100 mL 中) を 2.5 mL 加えた 15 mL チューブへ移し、15 分間振とうした。次いで平衡化 buffer B (1 M Tris-HCl (pH8.8) 5 mL, Urea 36.03 g, SDS 30 g, Iodoacetamide 2.5%, bromophenol blue 0.5 mg / 100 mL 中) を 2.5 mL 加えた 15 mL チューブへ移し、15 分間振とうした。平衡化した Immobiline Dry Strip を SDS-buffer で軽く洗浄し、4-20% SDS-PAGE にセットして電気泳動を行なった。二次元電気泳動終了後、SYPRO Red で染色して電気泳動像を撮影後、さらに CBB 染色を行ない、タンパク質のスポットを切

り出した。

３－２－６．LC-MS/MS 分析によるアミノ酸配列の解析

SDS-PAGE 又は二次元電気泳動によって精製したタンパク質は、内部アミノ酸配列の解析に用いた。分析は liquid chromatography (LC) 部分は nanoLC system paradigm (AMR)、mass spectrometry (MS) 部分は MS system LTQ (サーモサイエンティフィックスジャパン) を用いて行った。 LC 部分の分析条件は以下の通りである。カラムは Magic C18, 3 μm, 200 Å (50x0.2 mm i.d.) (Michrom Bioresources) を用い、移動相は A 液に 0.1%ギ酸, 2%アセトニトリル水溶液、B 液に 0.1%ギ酸, 90%アセトニトリル溶液を用い、流速は 1.5 μL/min、グラジェントは B 液 5%→45% (20 分) とした。MS 部分の分析条件は MS 及び data-dependent MS/MS mode、mass/charge は 400～2000 (m/z) で測定を行った。ペプチドの帰属にはデータベースとして National Center for Biotechnology Information nonredundant databases (NCBI databases) を用い、解析ソフトは Bioworks software version 3.1 (サーモサイエンティフィックス) を用いた。さらに、*de novo* 配列解析をサーモサイエンティフィックスジャパン社の好意により行なっていただき、内部アミノ酸配列の解析を行なった。解析には Serveyo LC システム (サーモサイエンティフィックス) と MS システム LTQ-orbitrap mass spectrometer (サーモサイエンティフィックス) を用いた。LC-MS/MS は Zorbax SB-300 カラム (0.075 mm×50 mm、アジレントテクノロジー) を用い、200 μL/min の流速で行なった。移動相は A 液:0.1%ギ酸と B 液：0.1%ギ酸を含む 80%メタノール溶液を用い、5% B 液で分析を開始し、直線的に 65 分後に 5%から 55%B 液に勾配をかけた。次に 100%B 液で 10 分間維持し、最後に 15 分かけて 5%B 液に戻した。

３－２－７．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

３－２－７－１．「エノキタケ」からの total-RNA 及び遺伝子断片の単離

エノキタケ培養菌糸体約 1 g を乳鉢を用いて液体窒素下で破砕した。Total-RNA の単離は TRI Reagent (シグマ　アルドリッチ) を用いてプロトコールに従って行った。単離した total-RNA 約 4 μg からサーモスクリプト RT-PCR システム (ライフ　テクノロジー) を用いて 55℃、50 分間反応で cDNA を合成し、これを鋳型としてメチルトランスフェラーゼ酵素遺伝子の単離を行った。酵素遺伝子の単離には得られたアミノ酸配列の情報をもとにデジェネレートプライマーを設計し、PCR を行った。設計したプライマー配列及び PCR 条件 1 を下記に記す。

デジェネレートプライマー

フォワード側：GAGGT(G/C)GG(A/C)AC(C/T)(C/T)T(G/A/T)GG(A/C)GG
(G/C)TA

リバース側　：GC(G/T)(G/C)AC(A/C/G)AC(A/G)TT(A/G)TC(A/C)AC

PCR 条件 1：94℃,5 min→(94℃,1 min→55℃,1 min→72℃,1 min)×40→72℃,7 min

PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動にかけ、増幅したバンドを QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。回収した DNA 断片は pGEM-T ベクター (プロメガ) へクローニングし、大腸菌 JM-109 株 (タカラバイオ) へ形質転換した。得られた形質転換体を LB 培地にて 37℃で終夜振とう培養し、QIAprep Spin Miniprep Kit (キアゲン) によりプラスミドを抽出した後、インサートの塩基配列を Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) 及び ABI PRISM 3100-AVANT Genetic Analyzer (アプライドバイオシステムズ) により確認した。

３－２－７－２．RACE-PCR 法による 5’側遺伝子の単離

塩基配列の解析で得られた配列情報をもとにし、RACE-PCR 法により 5’側 cDNA の単離を行った。5’RACE-PCR は単離した total-RNA 2.5 μg から FVOMT-5’GSP1 プライマーを用い、サーモスクリプト RT-PCR システム (ライフ テクノロジーズ) を用いて 55℃、50 分間反応させて cDNA を合成した。得られた cDNA から 5’RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends,Version 2.0 (ライフ テクノロジーズ) を用い、FVOMT-5’GSP1、FVOMT-5’GSP2 プライマーを用いて PCR を行い (PCR 条件 2)、5’側の単離をプロトコールに従って行なった。得られた PCR 産物は上記と同様にして 1%アガロースゲル電気泳動後、アガロースゲルから回収し、pGEM-T ベクターへクローニング後、大腸菌 JM109 株へ形質転換して塩基配列を確認した。

プライマー配列

FVOMT-5’GSP1：AGCCTCTTAGCCTCAACAAAGTA

FVOMT-5’GSP2：TCTTCGAGCTCGAAGGTGAT

PCR 条件 2：94℃,5 min→(94℃,1 min→60℃,1 min→72℃,1 min)×40→72℃,7 min

３－２－７－３．RACE-PCR 法による 3’側遺伝子の単離

3’RACE-PCR はサーモスクリプト RT-PCR システム (ライフテクノロジーズ) と 3’RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends,Version 2.0 (ライフテクノロジーズ) を用いて cDNA を合成し、FVOMT-3’GSP1、FVOMT-3’GSP2 プライマーを用いて PCR を行い (PCR 条件 3)、3’側の単離をプロトコールに従って行なった。得られた PCR 産物は上記と同様にして塩基配列を確認した。

プライマー配列

FVOMT-3’GSP1：ATCACCTTCGAGCTCGAAGA

FVOMT-3’GSP2：TACTTTGTTGAGGCTAAGAGGCT

PCR 条件 3：94℃,5 min→(94℃,1 min→60℃,1 min→72℃,1 min)×40→72℃,7 min

３－２－７－４．全塩基配列の決定

確認した5’末端及び3’末端の塩基配列情報をもとに遺伝子のORF領域の塩基配列の決定を試みた。なお使用するベクター及び大腸菌は、この後の組換え酵素の発現を念頭にしたものを使用した。FVOMT-5’NdeIとFVOMT-3’BamHIプライマーを設計し、Ex Taq DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いた。cDNAは3’RACE-PCRの際に合成したものを用い、PCRを行った (PCR条件4)。PCR産物を1%アガロースゲル電気泳動し、増幅バンドを回収した。回収したPCR産物をpGEM-Tベクターへクローニングし、大腸菌JM109株へ形質転換後、再度塩基配列を確認した。

プライマー配列

FVOMT-5’NdeI：TA*CATATG*TCCAACCCGACAAGCATACT

(イタリック体：*Nde*I サイト、下線部：ORF5’末端配列)

FVOMT-3’BamHI：TA*GGATCCA*AGTTTGATAGCGTACAAGAATCC

(イタリック体：*Bam*HI サイト、下線部：ORF3’末端配列)

PCR 条件 4：94℃,2 min→(94℃,30 sec→55℃,1 sec→72℃,1 min)×35→72℃,7 min

３－２－８．大腸菌を用いた組換え酵素の発現

ORF 領域をインサートに持つ pGEM-T ベクターから制限酵素 *Nde*I と *Bam*HI で切断

し、1%アガロース電気泳動後、インサートを回収した。インサートを pET28a (+) ベクター (メルク KGaA) の *Nde*I、*Bam*HI サイトへクローニングした後、大腸菌 BL21 (DE3) 株 (ストラタジーン) へ形質転換した。得られた形質転換体を LB 培地にて 37℃、160 rpm で約 16 時間振とう培養した後、その一部を再度新しい LB 培地へ添加して培養した。$O.D._{600}$=0.6 付近で IPTG を最終濃度 1 mM になるように添加し、28℃、160 rpm で 5 時間振とう培養して酵素タンパク質の発現誘導を行った。発現誘導した大腸菌を遠心分離し、沈殿物を 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM DTT 溶液に懸濁した。この大腸菌懸濁液を超音波摩砕し、再度遠心分離した。得られた上清を 12%SDS-PAGE にて電気泳動した。さらに得られた上清から His-tag カラム (His GraviTrap、GE ヘルスケア) を用いて精製し、PD-10 カラム (GE ヘルスケア) で脱塩処理を行なった後、20 mM リン酸 buffer (pH7.4) にて溶出し、発現酵素の精製を行った。

３－２－９．酵素活性

大腸菌を用いて発現させた酵素の活性を確認した。100 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.2 mM $MgCl_2$、0.25 mM EGCG、0.5 mM SAM 及び組換え酵素 1.5 mL からなる全量 3 mL の反応液を用いた。37℃で 10 分間反応させた後、1 M HCl を 70 μL 添加して反応を停止した。酢酸エチル 5 mL を加えて振とうし、遠心分離後の有機層を回収した。得られた有機層は窒素ガスを用いて濃縮乾固し、1 %アスコルビン酸ナトリウムを含む 30 % (v/v) メタノール溶液に溶解した。酵素反応物の分析は２章の「２－２－４」及び「２－２－５」と同様に行なった。

３－２－１０．メチル化カテキンの構造解析

大腸菌を用いて発現させた酵素を用いてEGCGと酵素反応させた結果、未知の生成ピークが確認された。そのため生成物ピークの単離、同定を行うために、酵素反応を「３－２－９」と同じ組成で行い、反応液の容量を1000 mLで行なった。酵素反応は37℃で

約16時間反応させた。6M HCLを7 mL添加した後、同量の酢酸エチルを加えて振とうした。酢酸エチル層を回収後、減圧濃縮にて乾固し、適量の30% (v/v) メタノール溶液に溶解した。得られた溶解液をHPLCに注入し、必要とするピーク画分を分取した。HPLCは第1章「１－２－５」と同じ機器を使用し、移動相は0.1%ギ酸を含む23% (v/v) アセトニトリルを用いて、流速12 mL/minで行った。得られた画分溶液をSep-Pak C18 35 cc (ウォーターズ) にアプライし、エタノールで溶出後、凍結乾燥して未知の化合物を得た。LC-TOF-MS及びNMRの測定は第２章「２－２－５」と同様に行い、化合物の構造を解析した。

３－２－１１．*O*－メチルトランスフェラーゼの至適 pH 及び至適温度

大腸菌を用いて発現させた酵素の至適 pH 及び至適温度を評価した。酵素反応は 0.25 mL 粗酵素液、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.05%アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。至適 pH 測定の場合は pH3-9 の範囲で測定し、pH3-5.5 酵素反応場合は 20 mM 酢酸 buffer、pH6-7 の場合は 20 mM リン酸 buffer、pH7.5-9 の場合は 20 mM Tris-HCl buffer を用いた。酵素反応は 37℃、20 分間行なった。至適温度測定の場合は 20 mM リン酸 buffer (pH7.0) を用いて行なった。反応終了後のメチル化カテキン量を HPLC で分析した。

３－２－１２．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

酵素反応後の各メチル化カテキン生成量の経時的変化を検討した。酵素反応の組成は 100 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.05%アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。大腸菌で発現させた酵素は、反応液 3 mL に対して 0.25 mL 加えた。他の操作は「３－２－９」と同様にし、反応液量を 30 mL にスケールアップした。酵素反応後組換え酵素の場合は 0、5、10、15、30、45、60、120、240 分後に 3 mL ずつ経時的に採取してサンプル処理し、HPLC にて各メチル化カテキンの生成量を分析

した。

３－２－１３．*O*－メチルトランスフェラーゼの基質特異性

酵素の基質特異性を評価するために、20 種類のポリフェノールを用いて酵素反応を行なった。酵素反応液は「３－２－９」と同様に行い、EGCG の変わりに別のポリフェノールを用いて反応させた。酵素反応は 37℃、10 分で行ない、大腸菌で発現させた酵素を用いた。得られたサンプルを同様に LC-TOF-MS にて解析した。ポリフェノールは(–)-epicatechin-3-*O*-gallate (エピカテキンガレート)、(–)-gallocatechin-3-*O*-gallate (ガロカテキンガレート)、(–)-catechin-3-*O*-gallate (カテキンガレート)、caffeic acid (カフェ酸)、chlorogenic acid (クロロゲン酸)、rosmarinic acid (ロズマリン酸)、ellagic acid (エラグ酸)、myricetin (ミリセチン)、luteolin (ルテオリン)、butein (ブテイン)、sulfuretin (サルフレチン)、procyanidin B2 (プロシアニジン B2)、phloretin (フロレチン)、astragalin (アストラガリン)、genistein (ゲニステイン)、*p*-cumaric acid (*p*-クマリン酸)、apigenin (アピゲニン)、daidzein (ダイゼイン)、resveratrol (レスベラトロール) 及び 3,4-dihydroxycinnamic acid (3,4-ジヒドロキシケイ皮酸)を用いた。

３－３．結果

３－３－１．各種「きのこ」菌糸培養物からの *O*－メチルトランスフェラーゼ活性の探索

各種培養菌糸体から抽出した粗酵素液を用いて EGCG と反応させ、メチル化体の生成の有無を指標に酵素活性を測定した。その結果、エノキタケ (*Flammulina velutipes*) から抽出した粗酵素を用いた場合に HPLC にて EGCG3"Me、EGCG4"Me、EGCG3",5"diMe の生成を標準品と比較することで確認した (図 3-1)。また、粗酵素液を煮沸した場合、酵素反応液から EGCG や SAM を除いた場合ではこれらメチル化体の生成は認められなかった。生成が確認された EGCG3"Me に関しては、LC-TOF-MS にてさらにその分子量を確認した。他の食用キノコ培養菌糸体から抽出した粗酵素液では、メチル化体の生成は確認できなかった。

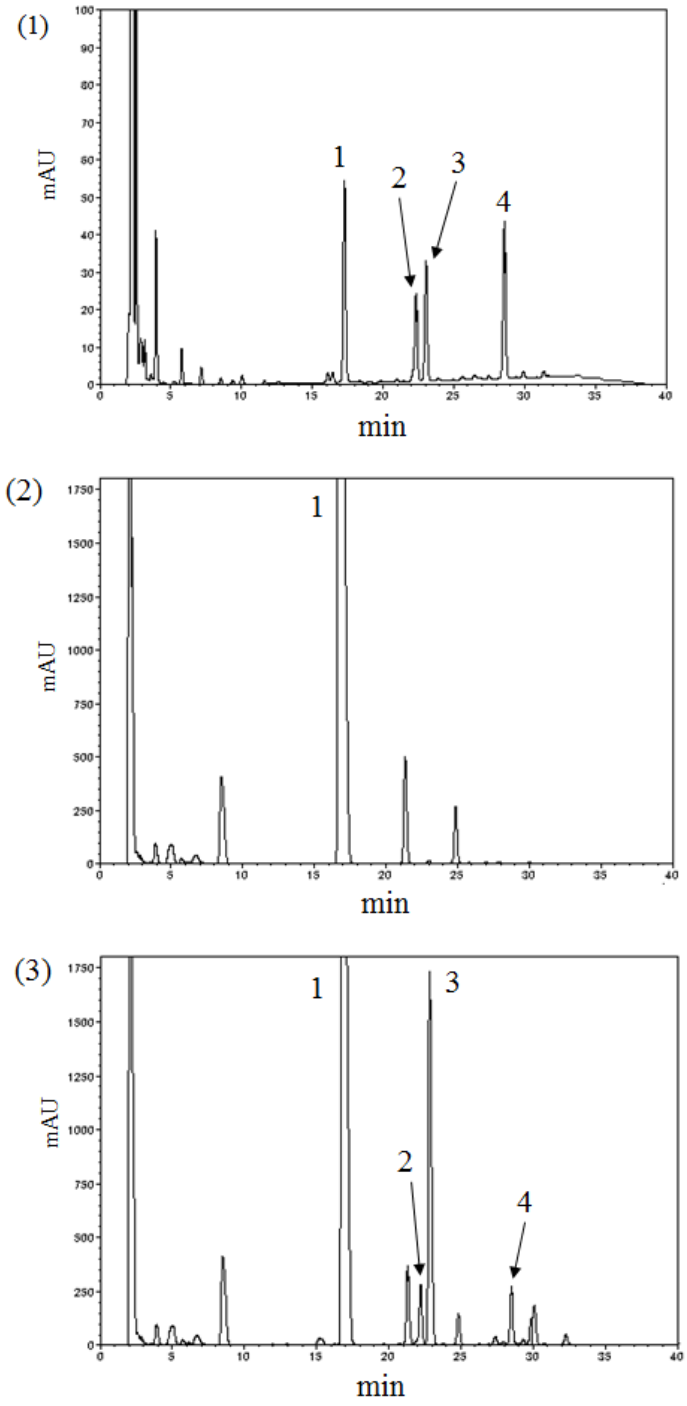


図 3-1. *F. velutipes* から抽出した粗酵素を用いた酵素反応物の HPLC クロマトグラム

(1) 標準物質、ピーク 1：EGCG、ピーク 2：EGCG4″Me、ピーク 3：EGCG3″Me、ピーク 4：EGCG3″,5″diMe。(2) 酵素を熱失活させた後に添加した時の反応物。(3) 酵素反応物。

３－３－２．酵素精製およびアミノ酸配列の解析

酵素精製ステップの要約を表 3-1 に示す。始めに予備検討としてエノキタケ菌糸体から粗酵素液を抽出し、硫酸アンモニウムを添加して 40、50、60、70、80%飽和画分を調整した。各画分を脱塩処理して酵素活性を測定した結果、60-80%の画分に活性が確認された。そのため、60-80%硫酸アンモニウム飽和画分を脱塩処理し、陰イオン交換カラム (HiPrep 16/10 DEAE FF)、疎水性相互作用カラム (Phenyl Sepharose HP Hiload 26/10) を用いて精製した。活性画分を 12%SDS-PAGE で確認したところ、まだ多数のバンドが確認され、特定することはできなかった。そのため得られた活性画分溶液の一部を強陰イオン交換カラム (TSK-gel BioAssist Q) を用いて精製し、12%SDS-PAGE にて確認した。その結果、候補となりうるバンドを 2-3 種類に絞り込むことが出来た (図 3-2)。しかし、回収した活性画分のタンパク質量が非常に少なかったことから、これ以上の精製は困難と判断した。そのため強陰イオン交換カラムで得られた候補のバンドと同位置のバンドを、疎水性相互作用カラム精製後の SDS-PAGE から切り出し、LC-MS/MS によるアミノ酸配列の解析に用いた。その結果、分子量約 24-25kDa のバンドから内部アミノ酸配列：VLEVGTLGGYSTTWLAR を得た。このアミノ酸配列をもとに NCBI のデータベースによるホモロジー検索を行った結果、*Laccaria bicolor* S238N-H82 (NCBI accession ID:XP_001878803.1) の *O*－メチルトランスフェラーゼの内部アミノ酸配列と高い相同性を示した。さらに純度の高いサンプルで再確認を行うために、同サンプルの二次元電気泳動を行った (図 3-3)。先のホモロジー検索の結果、高い相同性を示した既知の *O*－メチルトランスフェラーゼは等電点が pI5.1 であることが判明していたため、分子量約 24-25 kDa、pH5 付近の主要なスポットをゲルから切り出し、同様に LC/MS/MS による内部アミノ酸配列の分析を行った。その結果、その内の 1 スポットから、先に得られた内部配列と同じ配列を得ることができた。内部配列情報が得られたサンプルから別の情報を得るためにサーモフィッシャー・サイエンティフィック社に *de novo* 解析を依頼した。その結果、新たな内部アミノ酸配列：

TGGIIIVDNVVR を得ることができた。このアミノ酸配列を NCBI のデータベースによるホモロジー検索を行った結果、同じ *L. bicolor* S238N-H82 の *O*－メチルトランスフェラーゼと異なる位置で高い相同性を示した (図 3-4)。さらに他のキノコの *O*－メチルトランスフェラーゼとホモロジー検索を行なったところ、*Trametes versicolor* FP-101664 (EIW60464)、*Dichomitus squalens* LYAD-421 SS1 (EJF65784)、*Coprinopsis cinerea* Okayama7#130 (XP_002911017)及び *Stereum hirsutum* FP-91666 SS1 (EIM90245)とも高い相同性を示した(図 3-4)。

以上の結果から、エノキタケ (*F. velutipes*) から単離した酵素タンパク質は *O*－メチルトランスフェラーゼ酵素である可能性が非常に高いことが示唆された。本酵素名を Fv-OMT (*Flammulina velutipes O*-methyltransferase) とすることとした。

表3-1. *F. velutipes*からのFv-OMT精製ステップ

Step No.	Total protein (mg)	Yield (%)	Purification fold	Total activity (unit)	Specific activity (unit / mg)
1 crude extract	173.28	100.0	1.00	715.92	4.13
2 60 % to 80 % ammonium sulfate saturation	21.00	91.8	7.58	657.35	31.30
3 Anion-exchange chromatography (DEAE)	9.48	46.6	8.52	333.96	35.20
4 Hydrophobic interaction chromatography (Phenyl Sepharose HP)	2.19	16.7	13.24	119.84	54.70
5 Anion-exchange chromatography (BioAssist Q)	0.07	0.9	21.93	6.52	90.56

EGCGを基質として37℃で14時間反応させた時に1mmolのEGCG3"Meを精製する活性を1ユニットとした

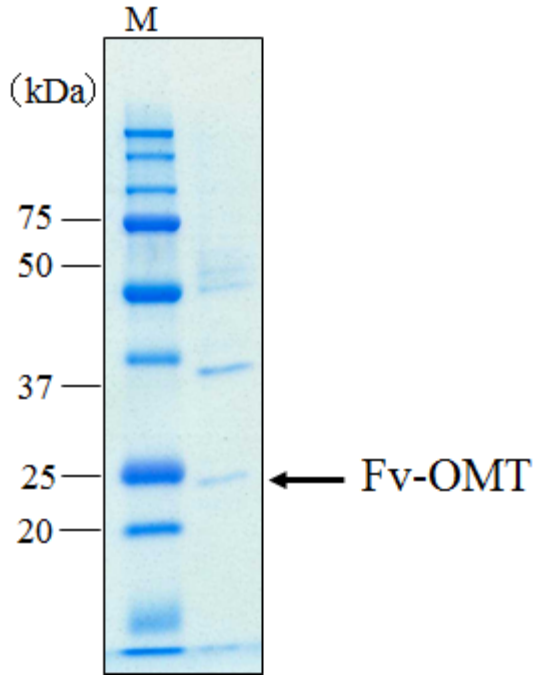


図 3-2. エノキタケ培養菌糸体から抽出した酵素の 12%SDS-PAGE 電気泳動像

菌糸体培養物から 60-80%硫酸アンモニウム沈殿、HiPrep 16/10 DEAE FF 陰イオンカラム精製、Phenyl Sepharose HP Hiload 26/10 疎水性相互作用カラム精製を行い、TSK-gel BioAssist Q 陰イオン交換カラム精製で精製したタンパク質を電気泳動した。

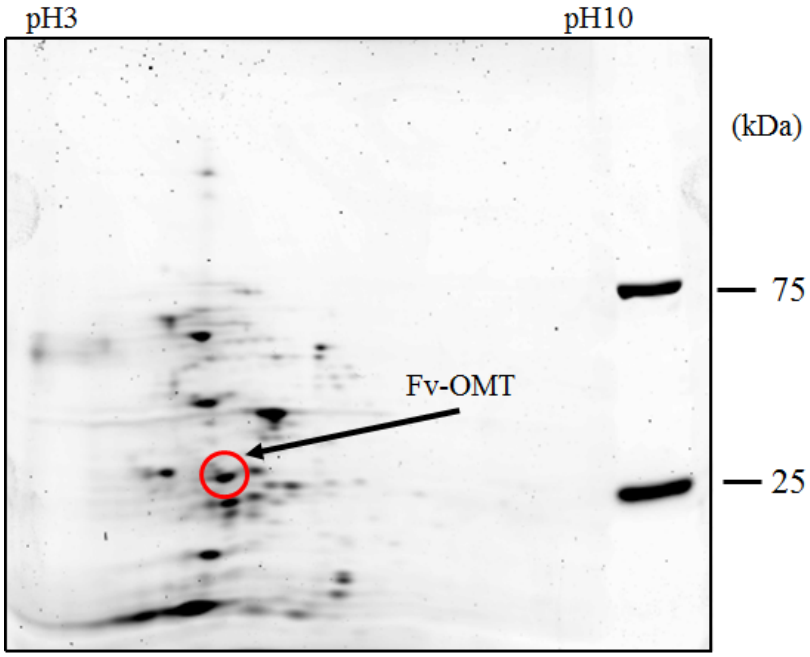


図 3-3. Fv-OMT を Phenyl Sepharose HP カラムで精製した後の活性画分の二次元電気泳動像

一次元は、Immobiline Dry Strip は Ettan IPGphor3 IEF System (GE ヘルスケアジャパン)を用いて pH 勾配 (pH3-10) の等電点電気泳動を行なった二次元電気泳動は 4-20% SDS-PAGE にセットして行なった。二次元電気泳動終了後、SYPRO Red で染色して電気泳動像を撮影後、さらに CBB 染色を行ない、タンパク質のスポットを切り出した。

Fv-OMT	V	L	E	V	G	T	L	G	G	Y	S	T	T	W	L	A	R
L.bicolor	I	L	E	V	G	T	L	G	G	Y	S	S	I	W	L	A	R
T.versicolor	I	L	E	V	G	T	L	G	G	Y	S	T	I	W	F	A	R
D.squalens	V	L	E	V	G	T	L	G	G	Y	S	A	I	W	L	A	R
C.cinerea okayama	I	L	E	V	G	T	L	G	G	Y	S	T	I	W	L	A	R
S.hirsutum	V	L	E	V	G	T	L	G	G	S	S	A	I	C	F	A	R

Fv-OMT	T	G	G	I	I	I	V	D	N	V	V	R
L.bicolor	K	G	G	V	I	I	V	D	N	V	V	R
T.versicolor	R	G	G	I	I	I	V	D	N	V	I	R
D.squalens	K	G	G	I	I	I	V	D	N	V	V	R
C.cinerea okayama	S	G	G	V	I	I	V	D	N	V	V	R
S.hirsutum	K	G	G	I	I	I	V	D	N	V	V	R

図 3-4. 解析した内部アミノ酸配列の比較

他のキノコである *L.bicolor*、 *T. versicolor*、 *D.sequalens*、 *C.cinerea okayama* 及び *S.hirsutum* との高い相同性を示した。一致したアミノ酸残基はグレーのボックスで示した。

３－３－３．*O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

アミノ酸の内部配列情報をもとに設計したデジェネレートプライマーを用いて遺伝子の単離を試みた結果、約 400bp の断片を得ることができた。塩基配列は *L. bicolor* S238N-H82 の *O*－メチルトランスフェラーゼと相同性を示した。そのため RACE-PCR 法を用いて全長の単離を試みた。単離した遺伝子の塩基配列を解析した結果、830 塩基であり、690 塩基からなる ORF をコードしてた。推定されるアミノ酸配列は 230 残基であった (DNA Data Bank of Japan acceccion ID:LC007086) (図 3-5)。アミノ酸配列より算出した推定分子量は 24.7kDa であった。単離した遺伝子 *Fv-OMT* のアミノ酸配列に対するホモロジー検索を行なったところ、担子菌である *L. bicolor* S238N-H82 の *O*－メチルトランスフェラーゼと 61.8%の相同性を示した (図 3-6)。また、担子菌の *T. versicolor* FP-101664 (EIW60464)、*D. squalens* LYAD-421 SS1 (EJF65784)、*C. cinerea* Okayama7#130 (XP_002911017) 及び *S. hirsutum* FP-91666 SS1 (EIM90245) と 57.1-61.6%の相同性を示した。これらの結果から、*Fv-OMT* はエノキタケから単離された新規の *O*－メチルトランスフェラーゼであることが判明した。

agacacacca cccaagctct gaaggattag ataaagcatt gacc atg tcc aac ccc 56
Met Ser Asn Pro
1

gac aag cat act acc tct ccg aag gaa tgg gaa gct gcc gac aag tac 104
Asp Lys His Thr Thr Ser Pro Lys Glu Trp Glu Ala Ala Asp Lys Tyr
5 10 15 20

ttc aac aac ctc ctc atc cct aaa gac gac gcg ctt gat gcg ggg ttg 152
Phe Asn Asn Leu Leu Ile Pro Lys Asp Asp Ala Leu Asp Ala Gly Leu
25 30 35

gcc cac gca gat gca tcc ggt cta cct aac atc gct gtc agc gct gcg 200
Ala His Ala Asp Ala Ser Gly Leu Pro Asn Ile Ala Val Ser Ala Ala
40 45 50

cag gga aag ttc ctt cat ctt ctg gca aga tcc ata ggt gcg aag agg 248
Gln Gly Lys Phe Leu His Leu Leu Ala Arg Ser Ile Gly Ala Lys Arg
55 60 65

gta ctc gag gtg ggg acg ttg gga gga tac tcg acg acg tgg ctc gct 296
Val Leu Glu Val Gly Thr Leu Gly Gly Tyr Ser Thr Thr Trp Leu Ala
70 75 80

aga gcg ctg cct gag gat gga gag gtc atc acc ttc gag ctc gaa gag 344
Arg Ala Leu Pro Glu Asp Gly Glu Val Ile Thr Phe Glu Leu Glu Glu
85 90 95 100

ttg cac gcc aag gtc gca gcg gag aac ctt gcg aag gct ggt gta gcc 392
Leu His Ala Lys Val Ala Ala Glu Asn Leu Ala Lys Ala Gly Val Ala
105 110 115

tcc aaa gtc aag atc gta gtt ggg cca gct cat gac tct ctg ctc aag 440
Ser Lys Val Lys Ile Val Val Gly Pro Ala His Asp Ser Leu Leu Lys
120 125 130

atc ccg tct gag ccc aag ttc gat ttg gcc ttt att gat gcg gat aag 488
Ile Pro Ser Glu Pro Lys Phe Asp Leu Ala Phe Ile Asp Ala Asp Lys
135 140 145

gag tcg aat ctc gag tac ttt gtt gag gct aag agg ctc gta agg act 536
Glu Ser Asn Leu Glu Tyr Phe Val Glu Ala Lys Arg Leu Val Arg Thr
150 155 160

gga ggc atc att atc gtg gac aac gtc gtc cga ggt gga agg gtg acc 584
Gly Gly Ile Ile Ile Val Asp Asn Val Val Arg Gly Gly Arg Val Thr
165 170 175 180

aac cct gag cat ccg cag tat gat agt ccg ggc tct gaa ggt gta cga 632
Asn Pro Glu His Pro Gln Tyr Asp Ser Pro Gly Ser Glu Gly Val Arg
185 190 195

aga ctc gct gca gcg ttg aaa gac gac aag gag gtt gac tcg acg gtg 680
Arg Leu Ala Ala Ala Leu Lys Asp Asp Lys Glu Val Asp Ser Thr Val
200 205 210

atc agc aca gtt gga gac aaa ggg tac gac gga ttc ttg tac gct atc 728
Ile Ser Thr Val Gly Asp Lys Gly Tyr Asp Gly Phe Leu Tyr Ala Ile
215 220 225

aaa ctt tga gaa aag gaa tag cag aga caa gaa gat aaa gga aat gta 776
Lys Leu
230

gac ttg caa tga att gac aac gta aac ggt aaa aaa aaa aaa aaa aaa 824

aaa aaa 830

図 3-5. *FvOMT* の全塩基配列及び推定アミノ酸残基

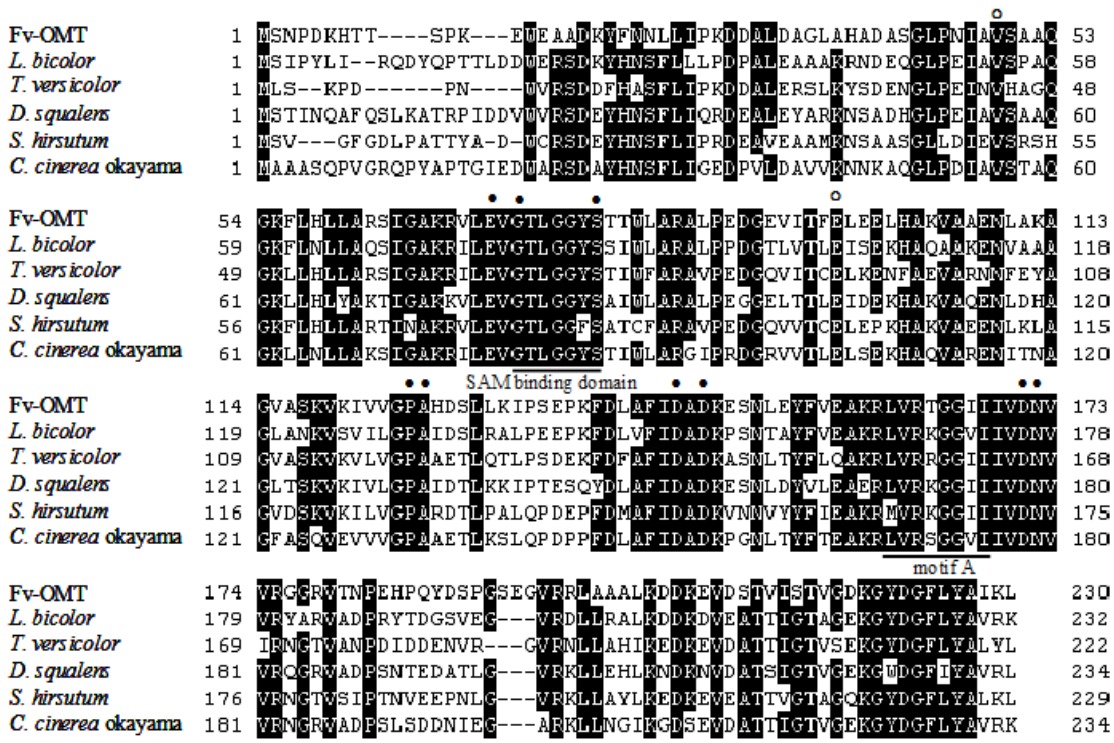


図 3-6. Fv-OMT のアミノ酸配列と *L. bicolor*、*T. versicolor*、 *D. squalens*、 *S. hirsutum* 及び *C. cinerea* okayama の *O*-メチルトランスフェラーゼとの比較

一致したアミノ酸は白字で示した。植物の CCoAOMT で高い保存性を示す二価金属結合部位を (●)で示した。哺乳類のカテコール *O*－メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列内で高い保存性を示す補因子結合残基を (○)で示した。

３－３－４．大腸菌を用いた組換え酵素の発現

単離した *Fv-OMT* を大腸菌で発現させ、精製した組換え酵素を 12%SDS-PAGE で電気泳動した結果、約 25kDa 付近に単一のバンドを確認することが出来た (図 3-7)。SDS-PAGE の結果とアミノ酸配列情報から、Fv-OMT の分子量は 24.7 kDa であることが判明した (約 5kDa のベクター由来発現タンパク質 (His-tag 配列を含む) が付加されている)。

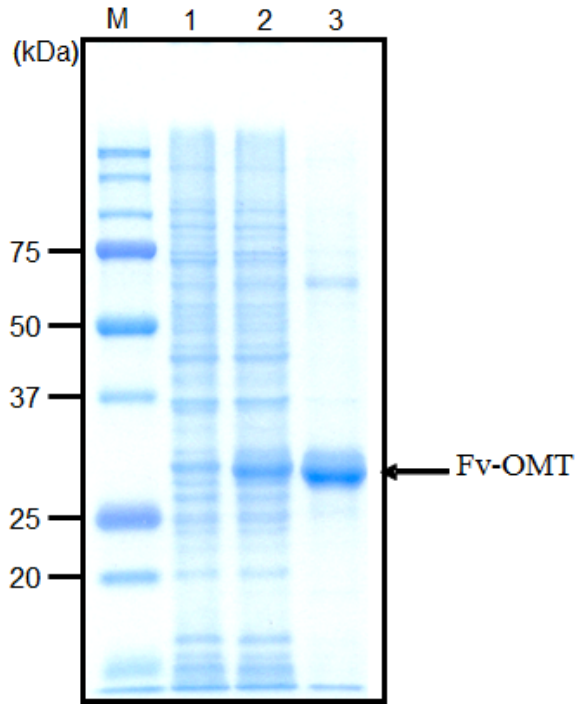


図 3-7. 発現した Fv-OMT 酵素 の 12%SDS-PAGE 電気泳動像

M：分子量マーカー、レーン 1：IPTG で誘導していない場合の大腸菌の粗酵素、レーン 2：IPTG で誘導をかけた場合の大腸菌の粗酵素、レーン 3：IPTG で誘導し、His-tag カラムで精製した場合の酵素

３－３－５．メチル化カテキンの構造解析

組換え酵素 Fv-OMT を用いて EGCG と反応させ、生成物を HPLC 及び LC-TOF-MS 分析したところ、EGCG3″Me、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe の生成を確認した。一方、2 種類の未知物質 Compound C (C-C) と CompoundC-D (C-D) と思われる吸収極大270～280nm付近のピークがHPLCのクロマトグラムにて新たに確認された (図3-8)。これらの物質を確認するために、酵素反応をスケールアップし、HPLC で分取し、白色の粉末を得た。この分取した物質を LC-TOF-MS 及び NMR で分析した。その結果、得られた LC-TOF-MS ネガティブモード及び ^{13}C NMR スペクトルデータ情報から化合物-5 は $C_{24}H_{22}O_{11}$ (m/z 485.1080 $[M-H]^-$, calcd for $C_{24}H_{21}O_{11}$, 485.1078) からなるエピガロカテキン-3-*O*-(4,5-*O*-ジメチル)ガレート (–)-epigallocatechin-3-*O*-(3,4-*O*-dimethyl)gallate (EGCG3″,4″diMe) であることが判明した (図 3-9)。同様に化合物-6 は $C_{25}H_{24}O_{11}$ (m/z 499.1239 $[M-H]^-$ calcd for $C_{25}H_{23}O_{11}$,499.1234) からなる 4-*O*-メチルエピガロカテキン-3-*O*-(3,5-*O*―ジメチル)ガレート(–)-4′-*O*-methylepigallocatechin-3-*O*- (3,5-*O*-dimethyl)gallate (EGCG4′,3″,5″triMe) であることが判明した (図 3-9)。

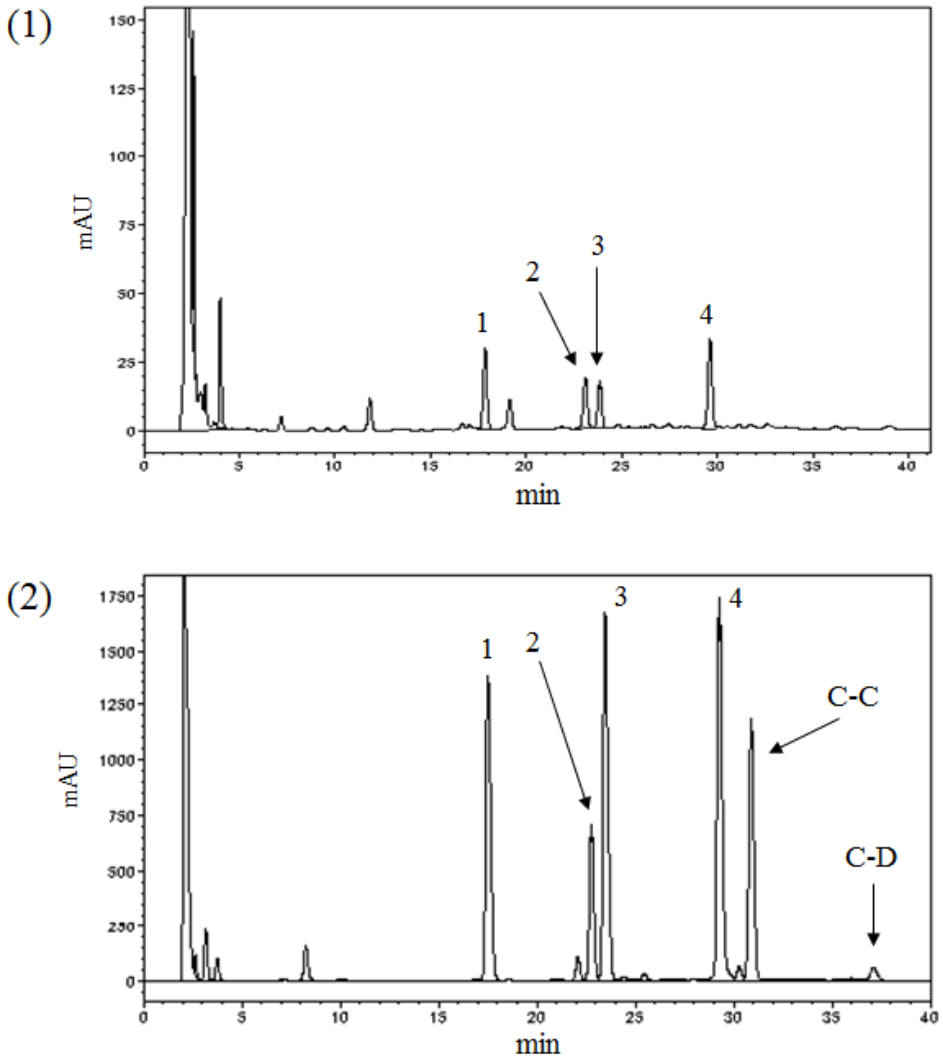
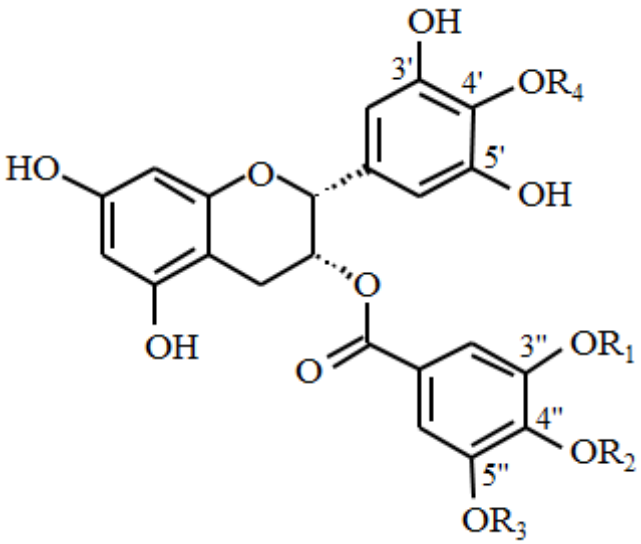


図 3-8. Fv-OMT を用いた酵素反応後の HPLC クロマトグラム

(1) 標準物質ピーク、1：EGCG、2：EGCG4″Me、3：EGCG3″Me、4：EGCG3″,5″diMe。

(2) 酵素反応物、2 種類の未確認物質のピーク Compound-C (C-C) と Compound-D (C-D) が検出された



Compounds	R_1	R_2	R_3	R_4
(−)-epigallocatechin-3-*O*-(3, 4-*O*-dimethyl)gallate (EGCG3",4"diMe)	CH_3	CH_3	H	H
(−)-4'-*O*-methylepigallocatechin-3-*O*-(3, 5-*O*-dimethyl)gallate (EGCG 4',3",5"triMe)	CH_3	H	CH_3	CH_3

図 3-9. EGCG3″,4″diMe と EGCG4′,3″,5″triMe の構造式

３－３－６．*O*－メチルトランスフェラーゼの至適 pH 及び至適温度

組換え酵素 Fv-OMT の至適 pH 及び温度を評価した。至適 pH は、pH6-9 の範囲で酵素の活性を確認でき、pH6.5 で最大の活性を示した (図 3-10 (1))。また、至適温度は 20‐60℃ (pH7.0) の範囲であることが確認された (図 3-10 (2))。この範囲の中で、40-50℃で最大の活性を示した。

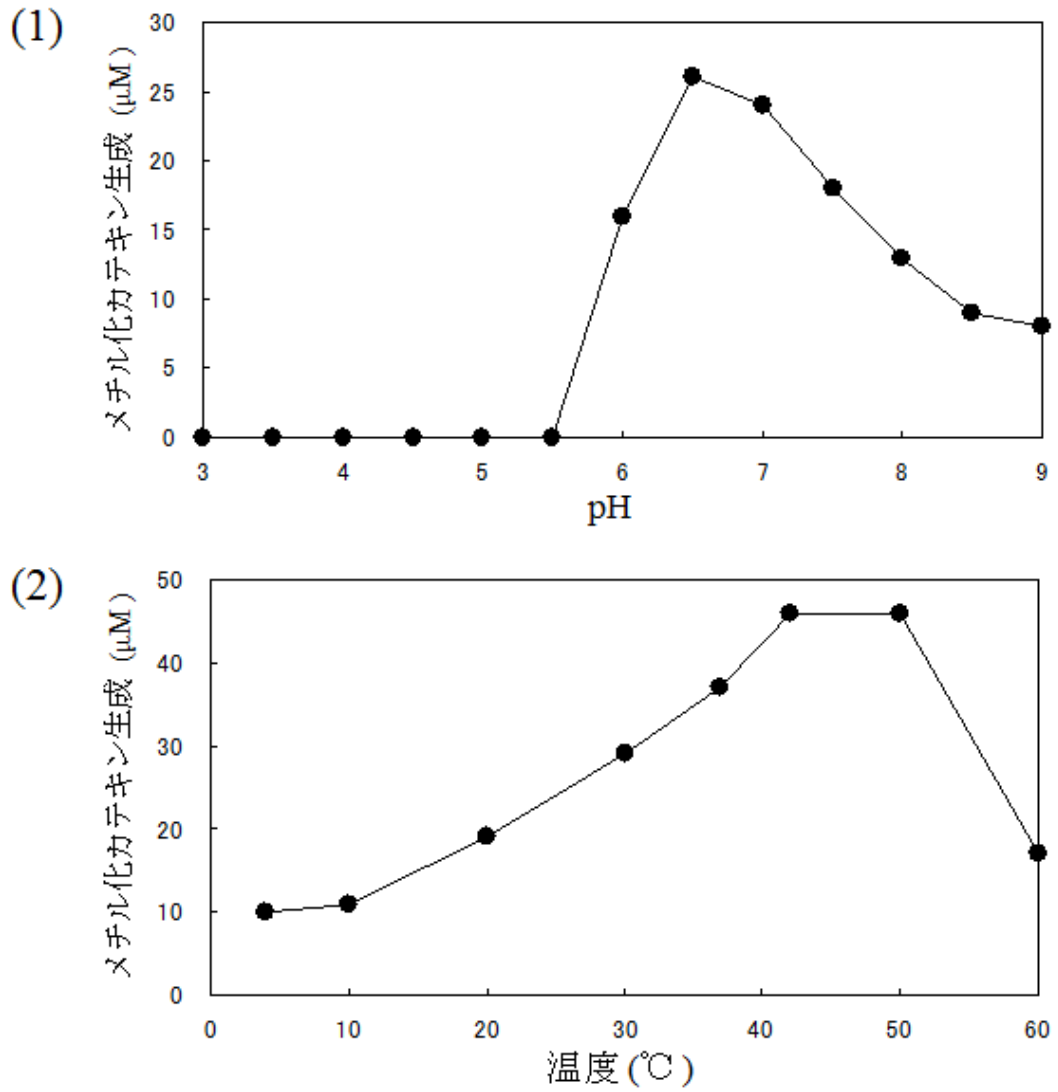


図 3-10. Fv-OMT の至適 pH (1) と至適温度 (2)

酵素活性はメチル化カテキンの生成を指標に示した。至適 pH 測定の場合は pH3-10 の範囲で測定し、酵素反応は 37℃、20 分間行なった。至適温度測定の場合は 20 mM リン酸 buffer (pH7.0) を用い、20 分間反応を行なった。反応終了後のメチル化カテキン量を HPLC で分析した。

３－３－７．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

酵素反応開始後、経時的にサンプリングし、各メチル化カテキン生成量の経時的変化を調査した。基質である EGCG は、反応 45 分後で検出されなくなった。EGCG3″Me の生成は反応直後に最大生成量を示し、その後速やかに減少した (図 3-11、表 3-2)。EGCG3″,5″diMe もまた、反応直後に生成量が増加し、30 分後に最大値を示した後、緩やかな減少を示した。一方、EGCG4′,3″,5″triMe は反応 240 分後まで、緩やかに生成量が増加した。EGCG4″Me の生成量は反応 60 分後に、EGCG3″,4″diMe は反応 30 分後にピークを示し、その後大きな変化は見られなかった。

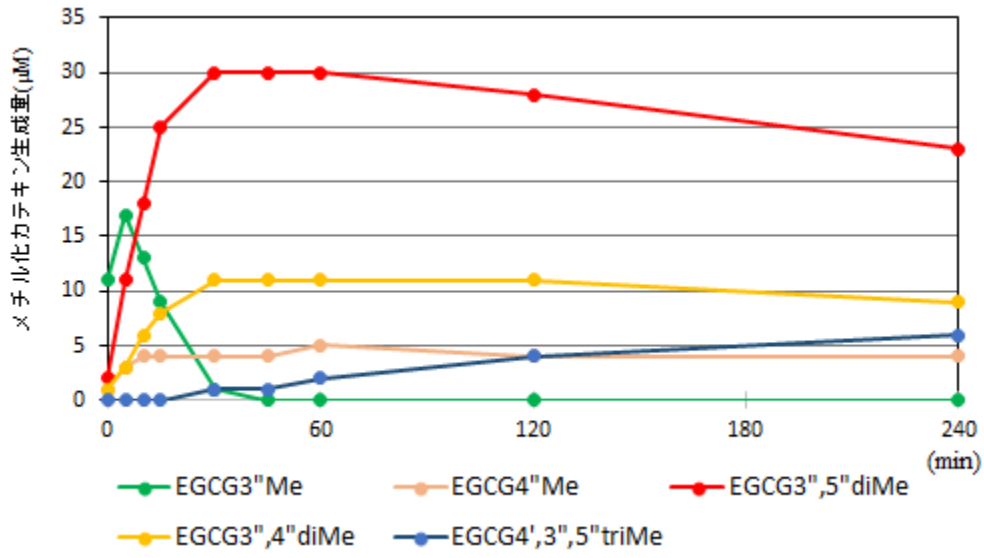


図 3-11. 組換え酵素 Fv-OMT 反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

酵素反応の組成は 100 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.05% アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。組換え酵素は、反応液 3 mL に対して 0.25 mL 加えた。反応液量をスケールアップし、経時的にサンプリングし、測定した。

表 3-2. 組換え酵素 Fv-OMT 反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

各メチル化カテキンの経時的生成濃度を数値で示した。

(μM)

化合物	0	5	10	15	30	45	60	120	240	(min)
EGCG3"Me	11	17	13	9	1	0	0	0	0	
EGCG4"Me	1	3	4	4	4	4	5	4	4	
EGCG3",5"diMe	2	11	18	25	30	30	30	28	23	
EGCG3",4"diMe	1	3	6	8	11	11	11	11	9	
EGCG4',3",5"triMe	0	0	0	0	1	1	2	4	6	
EGCG	41	20	11	5	1	0	0	0	0	

３－３－８．*O*－メチルトランスフェラーゼの基質特異性

酵素反応には大腸菌で発現させた組換え酵素を用いた。20 種類のポリフェノール化合物と反応させたところ、そのうちの 12 化合物でメチル化体の生成を確認した (図 3-12、表 3-3)。メチル化体が確認された化合物は(–)-epicatechin-3-*O*-gallate、(–)-gallocatechin-3-*O*-gallate、(–)-catechin-3-*O*- gallate、caffeic acid、chlorogenic acid、rosmarinic acid、ellagic acid、myricetin、luteolin、butein、sulfuretin 及び procyanidin B2 であった。一方、その他 8 種類のポリフェノール化合物では、メチル化体の生成が確認できなかった (図 3-13)。

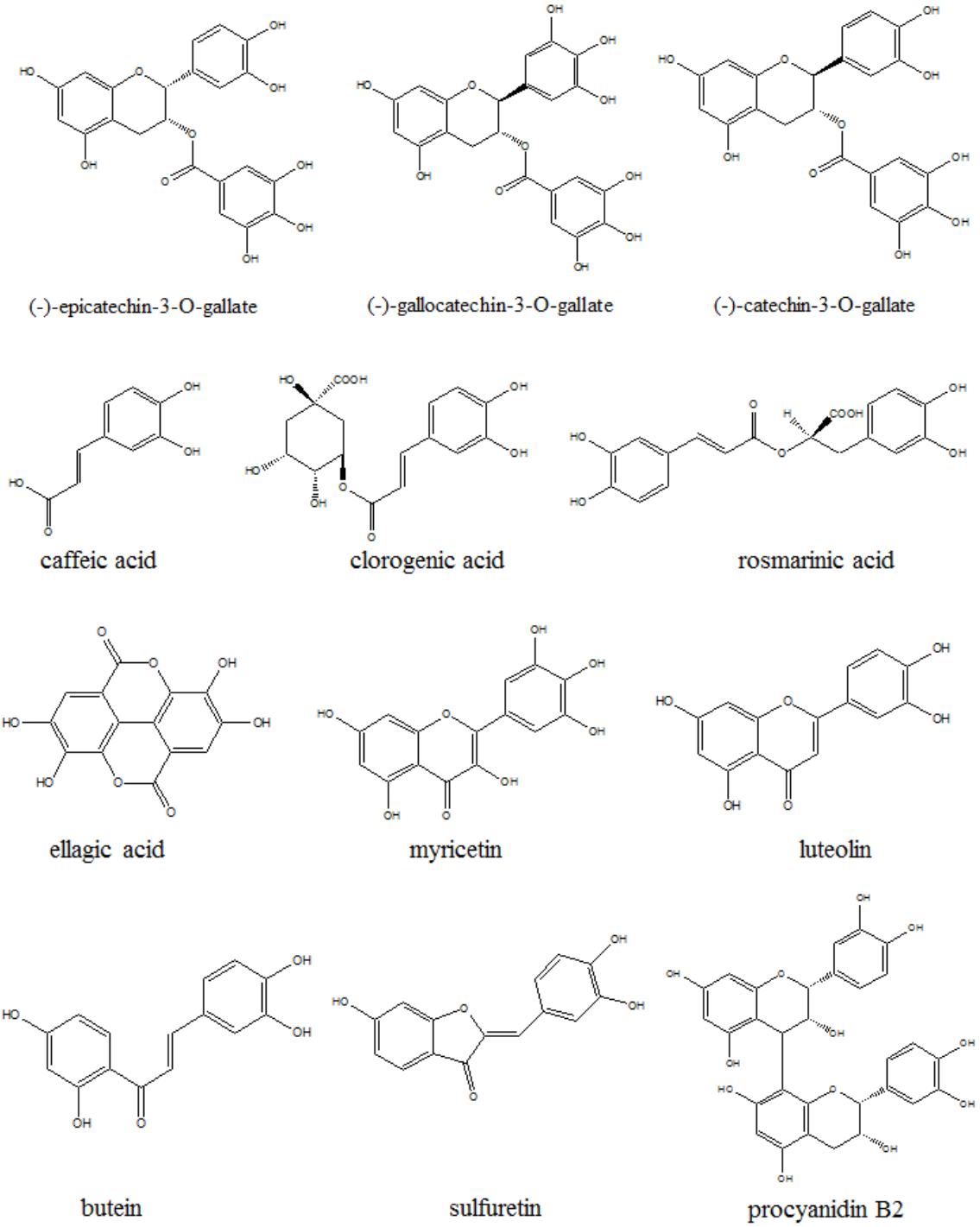


図 3-12. Fv-OMT によりメチル化したポリフェノール化合物

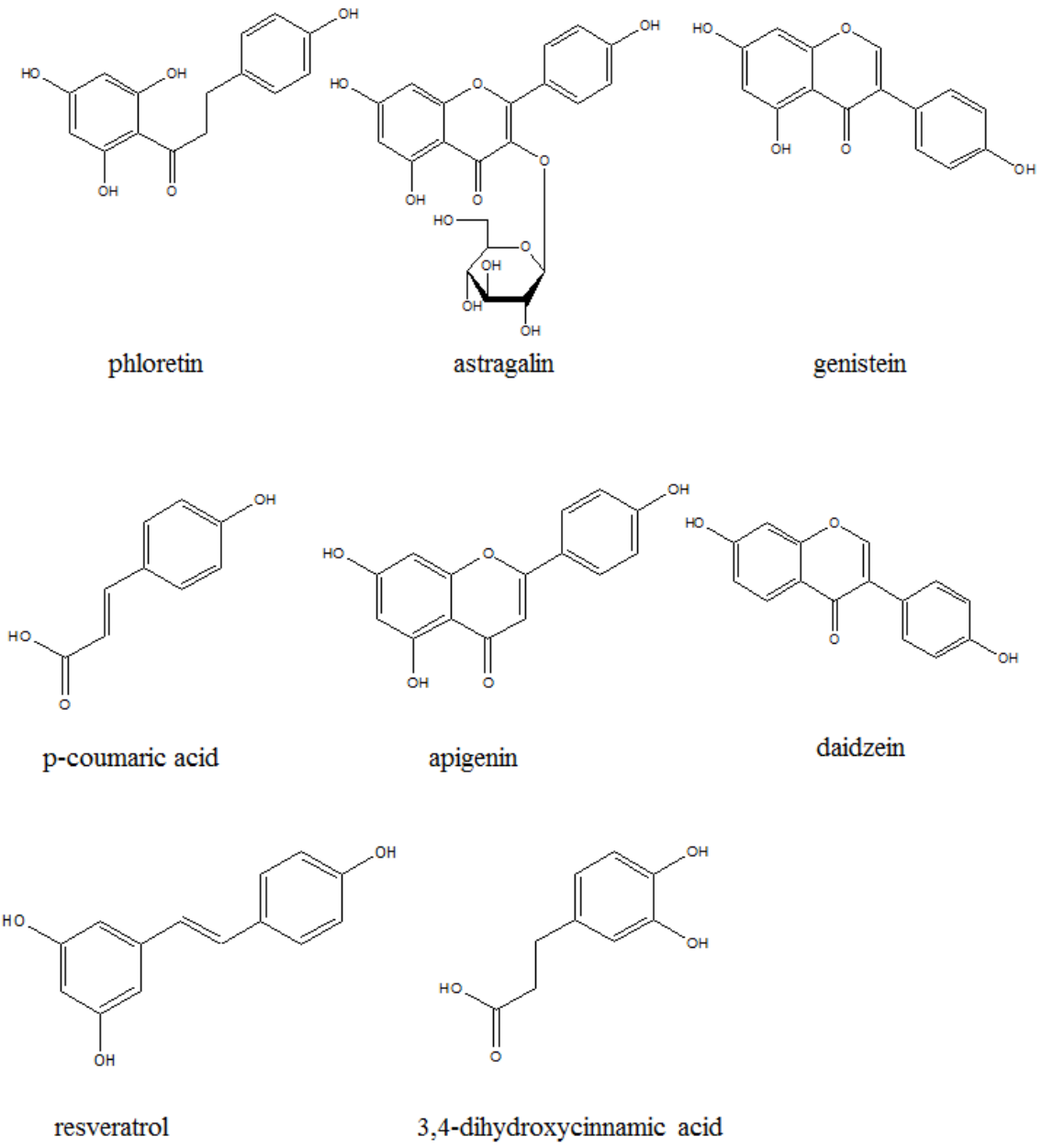


図 3-13. FvOMT によりメチル化が確認されなかったポリフェノール化合物

表3-3. Fv-OMT組換え酵素を用いて反応させたポリフェノール化合物のLC-TOF-MS分析

メチル化が確認されたポリフェノール及び確認されなったポリフェノール化合物

methylated compounds	substrate		methylated		di-methylated		tri-methylated	
	R.Time (min)	$[M-H]^-$ (*m/z*)	R.Time (min)	$[M-H]^-$ (*m/z*)	R.Time (min)	$[M-H]^-$ (*m/z*)	R.Time (min)	$[M-H]^-$ (*m/z*)
(–)-epicatechin	20.8	441.4	22.6	455.4	24.1	469.4	26.0	483.4
-3-*O*-gallate					25.0	469.4		
(–)-gallocatechin	19.8	457.4	22.5	471.4	24.5	485.4	26.4	499.4
-3-*O*-gallate					25.5	485.4	27.5	499.4
(–)-catechin	22.1	441.4	24.5	455.4	26.5	469.4	28.9	483.4
-3-*O*-gallate					27.5	469.4	30.0	483.4
caffeic acid	16.9	179.2	22.2	193.2				
			25.3	193.2				
chlorogenic acid	16.9	353.3	21.2	367.3				
			22.1	367.3				
rosmarinic acid	25.3	359.3	27.8	373.3	30.2	387.3		
ellagic acid	21.8	301.2	24.6	315.2	27.3	329.2		
			25.2	315.2	28.0	329.2		
myricetin	25.0	317.2	27.7	331.2	30.7	345.2		
			28.0	331.2	31.6	345.2		
luteolin	27.8	285.2	30.7	299.2				
butein	29.4	271.3	32.8	285.3				
sulfuretin	26.8	269.3	30.0	283.3				
			31.3	283.3				
procyanidin B2	17.5	557.5	20.5	591.5				
			21.7	591.5				

nonmethylated compounds			
phloretin	astragalin	genistein	*p*-coumaric acid
apigenin	daidzein	resveratrol	3,4-dihydroxycinnamic acid

３－４．考察

本研究では一般的に市販され、かつ食経験も豊富な 10 種類のキノコから菌糸体を単離し、その菌糸体培養物から抽出した粗酵素中のメチル化活性をスクリーニングした。その結果、エノキタケ培養菌糸体中に EGCG にメチル基を導入することが可能な酵素の存在を確認した。そのため酵素精製を試みた結果、候補となるタンパク質を同定した。SDS-PAGE より単離したバンドと二次元電気泳動で得られたスポットを LC-MS/MS 解析した結果、アミノ酸配列の一部を得ることができた。さらに *de novo* 解析をしたところ、別のアミノ酸配列を得ることができた。これら二種類のアミノ酸配のホモロジー検索をしたところ、*L. bicolor* のメチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列とほぼ一致した。そのためこれらの結果から、今回単離、精製した酵素はメチルトランスフェラーゼにほぼ間違いないことが示唆された。アミノ酸配列：VLEVGTLGGYSTTWLAR を他の 5 種のキノコのメチルトランスフェラーゼを比較したところ、17 アミノ酸残基のうち 11 残基が完全に一致した。また、残りの 6 残基も保存性の高いものであった。これらのキノコのメチルトランスフェラーゼは 222-234 アミノ酸残基から構成されていた。このアミノ酸数は CCoAOMT のクラス I に相当しているため、アミノ酸配列 (VLEVGTLGGYSTTWLAR) を比較したところ、SAM-binding domain である motif E (GVXTGYS) と得られた配列中の GTLGGYS が高い相同性を示していることが判明した[32]。そのため今回得られたアミノ酸配列の一部は、SAM との結合部位である可能性が示唆された。エノキタケから得られたもう一方のアミノ酸配列：TGGIIIVDNVVR を同様に他のキノコのメチルトランスフェラーゼと比較したところ、12 残基中 9 残基が完全に一致した。この領域を CCoAOMT と比較したところ、putative SAM-binding domain (LVXXGGXI) と高い相同性を示した。他 5 種のキノコにおけるこの領域のアミノ酸配列は(L/M)VRXGG(I/V)I であった。そのためこの領域も SAM との結合に関与していることが示唆された。白色腐朽菌のようなキノコからのメチルトランスフェラーゼに関する報告は、極僅かしかない。データバンクには幾つかのキノコ由来の配列情報があ

るものの、論文としては*P. chrysosporium* 由来の 3－*O*－及び 4－*O*－メチルトランスフェラーゼに関する報告のみであった[45][46]。これらの酵素はそれぞれ二量体と三量体であり、その分子量も 36、54 kDa である。Fv-OMT は相同性を示した他のキノコのメチルトランスフェラーゼ情報及び電気泳動の結果から、推定分子量は 25 kDa であった。

単離した*Fv-OMT*の塩基配列情報から得られたアミノ酸配列のホモロジー検索を行なったところ、他の担子菌の*O*－メチルトランスフェラーゼと相同性を示した。しかし、最も高い値を示した*L. bicolor* S238N-H82とも61.8%であった。これらの*O*－メチルトランスフェラーゼはSAMをメチルドナーとするものであった。このSAMをメチルドナーとする代表的な酵素にCCoAOMTが上げられる。CCoAOMT には232-248アミノ酸残基からなるクラスⅠと344-383アミノ酸残基からなるクラスⅡに分類され、FV-OMTはクラスⅠに分類されることが示唆された[32]。このクラスⅠに属する*O*－メチルトランスフェラーゼには3箇所のSAM結合部位であるA,B及びC領域の存在が提案されている[32]。A領域のコンセンサスなアミノ酸配列はLVXXGGXIであり、Fv-OMTのLVRTGGII (アミノ酸配列161-168の領域) と高い保存性を示した。しかしながらB及びC領域に対してFv-OMTは、保存性を有していなかった。他にCCoAOMTでは保存性の高いE領域 (EVXTGYS) であるSAM結合部位が提案されている[32]。Fv-OMTでは同様のアミノ酸配列73-79の領域にGTLGGYSが確認された。このアミノ酸7残基のうち、前半4残基は保存性が低く、残り3残基のGYSは完全に一致していた。そのため特にこの3アミノ酸残基がSAMとの結合に重要な役割を担っているものと推察された。また、CCoAOMTには9箇所の二価金属結合部位であるアミノ酸残基の存在が提案されており、Fv-OMTでも一致した[47]　(図3-6)。また他の担子菌においても、このアミノ酸残基を含む前後の配列を比較すると、非常に高い保存性を有していた。哺乳類のカテコール*O*－メチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列内で高い保存性を示す補因子結合残基においても、Fv-OMTで同領域に同じアミノ酸残基が確認された[32][47](図3-6)。担子菌由来の*O*－メチルトランスフェラーゼに関する論文報告で、*P. chrysosporium*より生成された3－*O*－及び4

―*O*―メチルトランスフェラーゼがある。しかし、これらの酵素の分子量は、それぞれ36 kDaと54 kDaであることから、Fv-OMTとは異なるものであった。この*P. chrysosporium*は既に全ゲノムが解析されており、その遺伝子情報も公開されている（http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html）。そのためFv-OMTとのホモロジー検索を行なったところ、230アミノ酸残基からなる*O*―メチルトランスフェラーゼの存在が明らかになり、56.6%の相同性を示した。

酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化を検討した。組換え酵素を用いた場合、基質の EGCG は酵素反応 30 分後で検出されなくなった。酵素反応開始直後 EGCG4″Me よりも EGCG3″Me が多く生成されたことから、Fv-OMT は EGCG のガロイル基の 4 位よりも 3 位の水酸基を優先的に認識してメチル基を導入することが示唆された。また、3 位の水酸基にメチル基を導入したあと (EGCG3″Me)、直ぐに 5 位を認識してメチル基を導入していることが推察された (EGCG3″,5″diMe)。EGCG3″,5″diMe の生成はその後穏やかに減少し、それとともに EGCG4′,3″,5″triMe が徐々に生成されたことから、EGCG3″,5″diMe の生成後、一部で B 環の 4 位が認識されるものと考えられた。一方、EGCG4″Me と EGCG3″,4″Me はそれぞれ反応 30 分後に生成量がピークに達し、その後の生成量に変化が見られなかった。そのため EGCG の一部で 4 位が認識されてメチル基が導入された後は、反応が進まずにストップするものと思われる。また同様に EGCG3″Me の一部で 4 位が認識されてメチル基が導入された後、反応は停止するものと思われた。そのため、これらの各メチル化カテキン生成量の経時的変化の結果から、ある程度の水酸基の認識順位や反応順位が推察することが出来た。しかし本酵素の更なる詳細な情報を得るためには、今後各種メチル化カテキンを基質とした酵素反応を行い、生成物の解析を行なうことが課題である。

20 種類のポリフェノール化合物を基質として酵素反応を行なった結果、そのうちの 12 種類の化合物からメチル化体の生成を確認できた。これらのメチル化したポリフェノール化合物の共通構造から、Fv-OMT は、主にα位の四級炭素を有するピロカテコー

ル及びピロガロール構造を認識してメチル基を導入することが示唆された (図 3-14)。一方、レゾルシノール、フロログルシノール及びフェノール構造を持つポリフェノールにはメチル基を導入することが出来なかった。EGCG を基質とした酵素反応では、HPLC のクロマトグラムで EGCG4′,3″,5″triMe の生成ピークを確認したが、(–)-epicatechin、(–)-epigallocatechin、(＋)-catechin や(–)-gallocatechin と反応させた場合のメチル化体と思われるピークは検出されなかった。しかし、LC-TOF-MS 分析では、これらのメチル化体と思われる分子量が検出された。これらのことから、Fv-OMT はガロイル基を優先的に認識することが考えられた。

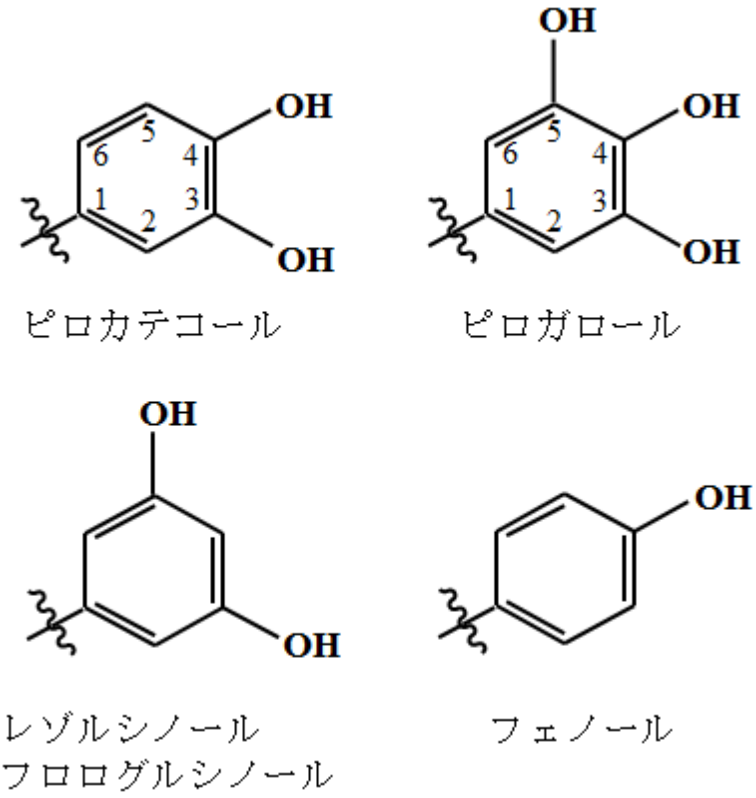


図 3-14. Fv-OMT の基質特異性

ピロカテコール及びピロガロール構造を認識した。レゾルシノール、フロログルシノール及びフェノール構造は認識しなかった。

本章ではエノキタケから初めて *O*－メチルトランスフェラーゼ遺伝子を単離することが出来た。そして Fv-OMT の性質と基質特異性を明らかにした。本酵素を用いれば、植物には極微量にしか含まれていないような様々なポリフェノールのメチル化体を合成することが可能となる。メチル基が導入されたポリフェノールは、その脂溶性の増加や代謝安定性の向上により、本来有している様々な機能性の向上を期待することができる。本酵素を用いてテアフラビンと反応させ、そのメチル化体である teaflavin 3-*O*-(3-*O*-methyl)gallate 及び teaflavin 3-*O*-(3,5-di-*O*-methyl)gallate を合成した[48]。これらのメチル化テアフラビンはテアフラビンと比較して人内臓脂肪における細胞内でのトリグリセライドの蓄積を効果的に抑制した[48]。さらに幾つかのメチル化テアフラビンを Fv-OMT を用いて合成し、pH7.5 の溶液中での代謝安定性を検討したところ、メチル化の方が安定性に優れていた[48]。また、テアフラビン又はメチル化テアフラビンを HepG2 細胞が含まれる溶液に添加し、過酸化水素処理後した後の細胞の生存率を比較したところ、メチル化体の方が良好な結果を示した[49]。これらのことから、Fv-OMT は様々なポリフェノール化合物のメチル化体を合成し、その機能性を評価するための有効な手段であることが言える。本章でも 20 種類のポリフェノールのうち、12 種類のポリフェノールのメチル化体の生成を確認することが出来た。本酵素を用いれば植物には極微量にしか含まれていないポリフェノールのメチル化体を効率よく合成することができ、機能性が向上した食品用素材の提供が期待できると思われる。

第４章

「エノキタケ」菌糸体のスケールアップ培養の検討

４－１．緒言

食経験のある担子菌 (キノコ) 菌糸体培養物は、その子実体と同様に様々な健康食品という形態で販売されている。代表的な物としてアガリクス、シイタケ、霊芝、カバノアナタケ、ハナビラタケなどの菌糸体培養物もしくはその抽出物などが、一般的に市場に流通、販売されている。そのため、エノキタケの菌糸体も同様に工業スケールで培養可能と思われた。

本章では、エノキタケ菌糸体培養をこれまでの三角フラスコ培養から、予備検討ではあるがスケールアップを試み、実生産培養を視野に入れたデータ取りを行った。まず、三角フラスコ培養で培地組成中の、pH、炭素源及び窒素源の検討を行い、実生産培養に必要な基本的な組成の情報把握を行った。次に 5 L ジャーファーメンターへスケールアップし、三角フラスコでは評価できない撹拌の速度と種類、通気量等の確認を行った。得られた情報をもとに、最後は 90 L 培養タンクでスケールアップの確認を行った。90 L 培養で培養できれば、経験的ではあるが、その後の工業での生産が可能であると言える。まだ培養方法等に関して検討すべき課題が多く残されているが、その可能性を十分期待できる結果が得られた。

また、培養した菌糸体から粗酵素を抽出し、メチル化カテキン生成物の経時的変化を確認するとともに、酵素の至適 pH と温度の確認を行った。これにより実際の酵素変換によるメチル化カテキンの製造に向けた評価を行った。

４－２．実験材料及び方法

４－２－１．試薬及び資料

本実験で用いたエノキタケ (*Flammulina velutipes*) 菌糸体は第３章で単離したものを用いた。Peptone、Yeast Extract、Potato Dextrose Broth はベクトン・ディッキンソン社製を使用した。HPLC 分析に使用したアセトニトリル及びメタノールは HPLC 分析用のものを使用し、それ以外は特級グレードのものを使用した。EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe は第２章にて単離、精製したものを使用した。その他の試薬類は特級もしくは HPLC グレードを使用した。

４－２－２．培養菌糸体凍結乾燥物を用いた酵素反応

エノキタケ菌糸体を液体培養し、得られた菌糸体をフィルターろ過して集菌した後、凍結乾燥機にて一晩凍結乾燥した。得られた菌糸体乾燥物 25 mg に 20 mM Tris-HCl (pH7.5) 水溶液 1.5 mL 加え、超音波破砕した。得られた破砕液 1 mL を用いて 20 mM Tris-HCl (pH7.5), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.25 mM EGCG, 0.5 mM SAM を添加し、全量 3 mL で 37℃、16 時間反応させた。酵素反応後に 1 M HCl 70μL、酢酸エチル 5 mL を加えて攪拌し、遠心分離して有機層を回収した。有機層を窒素で乾固した後、1%アスコルビン酸を含む 30% (v/v) メタノール溶液に溶解し、これまでと同様の条件で HPLC を用いて測定した。

４－２－３．培地の至適 pH の検討

培地は Peptone 1%、Yeast Extract 0.2%、グルコース 2%、KH_2PO_4 0.2%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%を含む組成を本試験の基本培地として培養した。この培地の pH を HCl 又は NaOH を用いて 4.5 から 8.0 まで 0.5 ずつ変更して調製し、検討した。プレート培養した菌糸体に滅菌したチップの反対側で印をつけ、その内側の菌糸体をかき取ることで、極力一定量を植菌した。培養は 150 rpm、20℃で 5 日間培養した。得られた菌糸体培養液を

ろ過して菌糸体を回収し、凍結乾燥後の重量及び酵素活性を測定した。酵素活性測定は菌糸体 1 mg 辺りの EGCG3″Me 生成量 (μM) を指標とした。酵素反応後の活性測定は「４－２－２」と同様に行なった。

４－２－４．培地中の炭素源の検討

基本培地中 (pH5.5) の炭素源をデンプン、ガラクトース、トレハロース、フルクトース、ラクトース、スクロース、マルトースまたはキシロースへ変更し、菌糸体の増殖及び酵素活性を比較検討した。各炭素源は 2 g/100 mL を加えた。菌糸体の培養条件、増殖量及び酵素活性及びは「４－２－２」及び「４－２－３」と同様に行った。

４－２－５．培地中の窒素源の検討

基本培地中 (pH5.5) の窒素源である Peptone と Yeast Extract の組成を変更することで、菌糸体の増殖及び酵素活性を比較検討した。窒素源は Peptone 1%、Peptone 2%、Yeast Extract 2%、Peptone と Yeast Extract をそれぞれ 2%、Cassamino acid 2%または Potato Dextrose Broth 2.4%の各組成で検討した。

４－２－６．5 L ジャーファーメンターを用いた菌糸体培養方法の検討

ジャーファーメンターは㈱三ツワフロンテック社製を用いて検討した。培地組成は Peptone 2%、Yeast Extract 1%、KH_2PO_4 0.2%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%、グルコース 2%、p5.5 を用い、3 L の張り込みで行い、20℃で 5 日間培養した。三角フラスコで約 5 日間培養した菌糸体培養液 60 mL を植菌した。この時の培養液は同じ組成の物を用いた。攪拌翼は HS-100 型又はディスクタービン型を用いた (図 4-1)。培養温度、通気量及び攪拌数は適宜調整した。

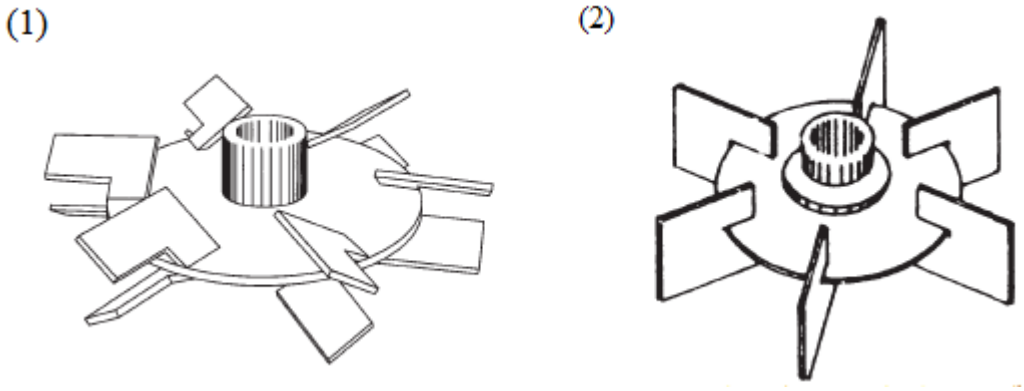


図 4-1.　培養時に用いた撹拌翼の形状

(1) HS100 型撹拌翼

(2) ディスクタービン型撹拌翼

(佐竹化学工業株式会社のカタログより転用)

４－２－７．90 L 培養タンクを用いた検討

90 L 培養設備は㈱三ツワフロンテック社製のものを使用した。培地組成は基本培地を用いて 60 L 調製して張り込み、回転数 19 rpm、通気量 0.5 vvm、24℃で 5 日間培養した (培養タンクの冷却能力の限界が 24℃であった)。培地の pH は炭素源又は窒素源の検討時では 5.5 に調整したが、汚染のリスクを少しでも下げるために、pH5.0 に調整した。培養タンク 2 機を使用し、一方は攪拌翼にディスクタービン、もう一方には HS-100 を用いて比較検討した。種菌は三角フラスコで 250 ml×6 本分を培養し、その全量を植菌した。

４－２－８．至適 pH 及び至適温度

酵素反応は 0.25 mL 粗酵素、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.04%アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。至適 pH 測定の場合は pH3-10 の範囲で測定し、pH3-5.5 酵素反応場合は 20 mM 酢酸 buffer、pH6-7 の場合は 20 mM リン酸 buffer、pH7.5-10 の場合は 20 mM Tris-HCl buffer を用いた。酵素反応は 37℃、6 時間で行なった。至適温度測定の場合は 20 mM リン酸 buffer (pH7.0) を用い、6 時間反応で行なった。反応終了後のメチル化カテキン量を HPLC で分析した。

４－２－９．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

酵素反応後の各メチル化カテキン生成量の経時的変化を検討した。酵素反応の組成は 100 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.05%アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。菌糸体培養物抽出粗酵素は、反応液 3 mL に対して 0.25 mL 加えた。他の操作は第３章「３－２－１２」と同様にし、反応液量をスケールアップした。酵素反応後 0、5、10、15、30、45、60、120、240、480、720 分後に 3 mL ずつ経時的に採取してサンプル処理し、HPLC にて各メチル化カテキンの生成量を分析した。

４－３．結果

４－３－１．培地の至適 pH の検討

エノキタケ菌糸体の培養条件を三角フラスコスケールで検討した。基本培地の pH を 4.5 から 0.5 ずつ pH8.0 まで調製し、増殖した菌糸体の重量を測定した (図 4-2 (1))。その結果 pH5.0 から 8.0 まで多少の重量の差は見られたものの、pH の違いに対して一定の傾向は見られなかった。酵素活性に関しても EGCG3″Me の生成量は菌糸体重量の場合と同様に、pH の違いによる影響は見られなかった (図 4-2 (2))。

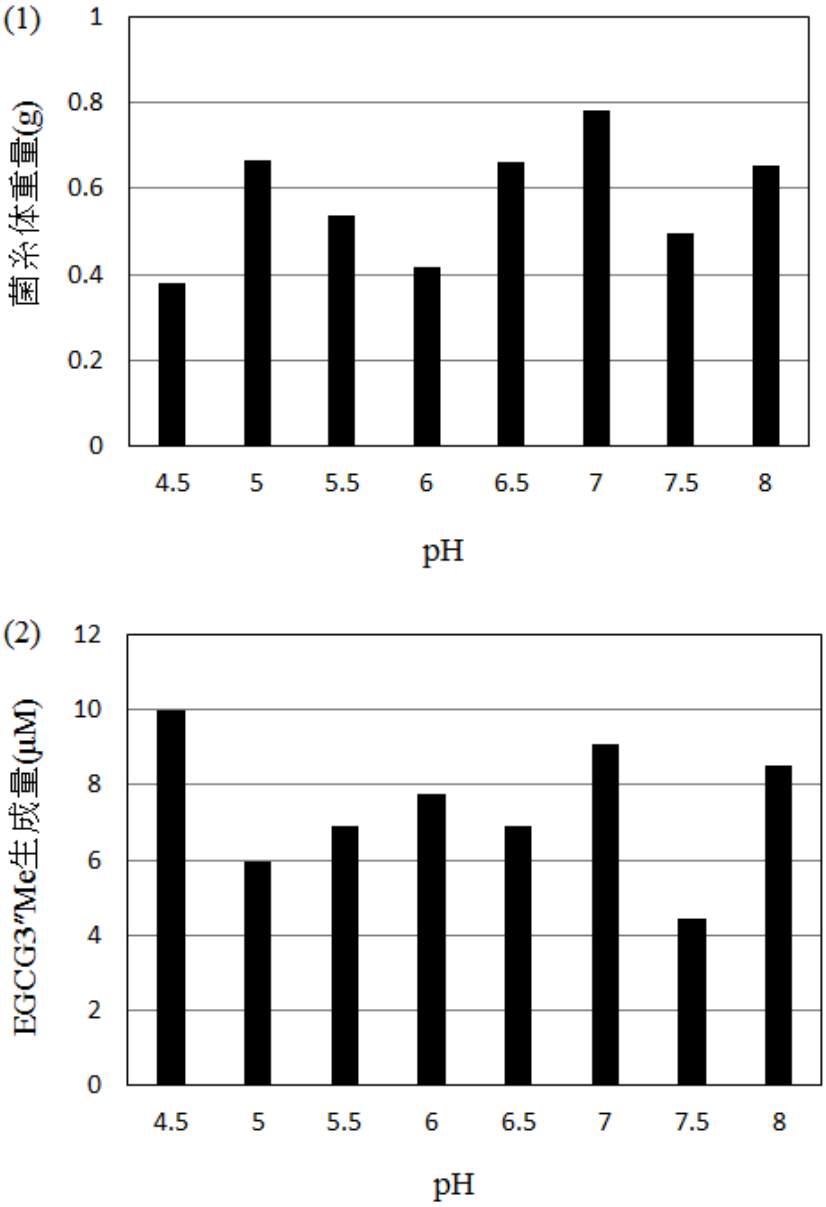


図 4-2. pH の違いによる酵素活性の変化

(1)pH の違いによる菌糸体重量の変化。(2)pH の違いによる酵素活性の変化。培地の pH を HCl 又は NaOH を用いて 4.5 から 8.0 まで 0.5 ずつ変更し、検討した。培養は 150 rpm、20℃で 5 日間培養した。得られた菌糸体培養液をろ過して菌糸体を回収し、凍結乾燥後の重量及び酵素活性を測定した。酵素活性測定は菌糸体 1 mg 辺りの EGCG3″Me 生成量を指標とした。

４－３－２．培地中の炭素源の検討

次に炭素源の検討を行い、基本培地の pH は 5.5 とした。その結果、菌糸体重量ではスクロースを用いた場合に高い値を示した (図 4-3 (1))。一方、グルコースを炭素源とする基本培地と比較すると、ガラクトース、トレハロース、ラクトース、キシロースは増殖量が低い傾向にあった。酵素活性に関しては、菌糸体重量と同様にスクロースが高い値を示したが、他の炭素源では菌糸体の重量辺りの酵素活性はほぼ同程度であった (図 4-3 (2))。キシロースに関しては酵素活性も低いものであった。これらの結果から、炭素源の違いは菌糸体の増殖量に影響を与えるが、菌糸体自体の酵素活性に関してはそれほど影響しないことが判明した。

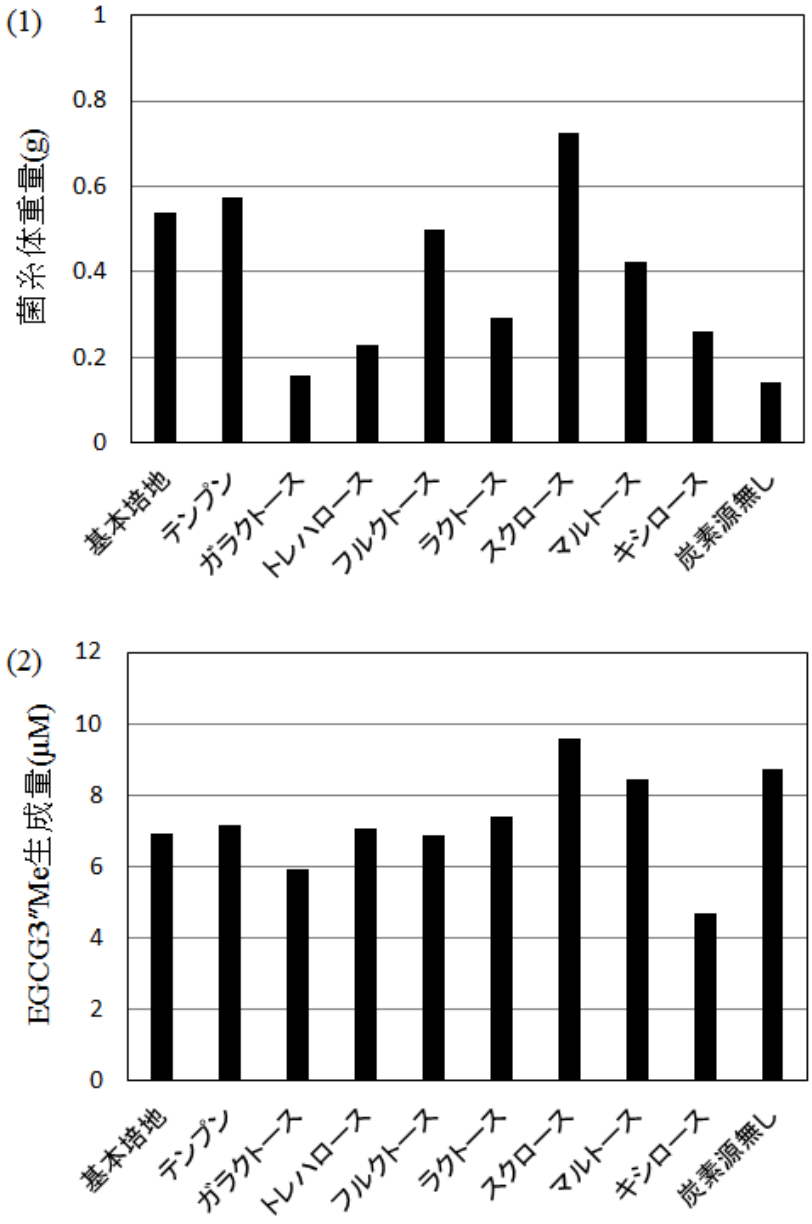


図 4-3. 炭素源の違いによる酵素活性の変化

(1)炭素源の違いによる菌糸体重量の変化。(2)炭素源の違いによる酵素活性の変化。基本培地中 (pH5.5) の炭素源を変更し、菌糸体の増殖及び酵素活性を比較検討した。各炭素源は 2 g/100 mL を加えた。酵素活性測定は菌糸体 1 mg 辺りの EGCG3″Me 生成量を指標とした。

４－３－３．培地中の窒素源の検討

次に窒素源の検討を行った。菌糸体の増殖に関しては Peptone と Yeast Extract をそれぞれ 2 g ずつ加えた場合に菌糸体の増殖が良い傾向にあった (図 4-4 (1))。Cassamino acid または Potato Dextrose Broth (PDB) では明らかに増殖が悪かったが、他の組成ではほぼ同程度であった。

酵素活性では、Peptone 2g を加えた場合で良好な値を示した (図 4-4 (2))。一方、Yeast Extract 2%と PDB では、基本培地より悪い結果であった。そのため Peptone を増やすことで、菌糸体の培養に良い傾向が見られた。一方、Peptone 1%を加えた場合で EGCG3″Me の生成量が 26.3 μM の値を示し、同じ Peptone 2 g を加えた場合の 2 倍以上の値を示したことから、異常値を判断し棄却した。

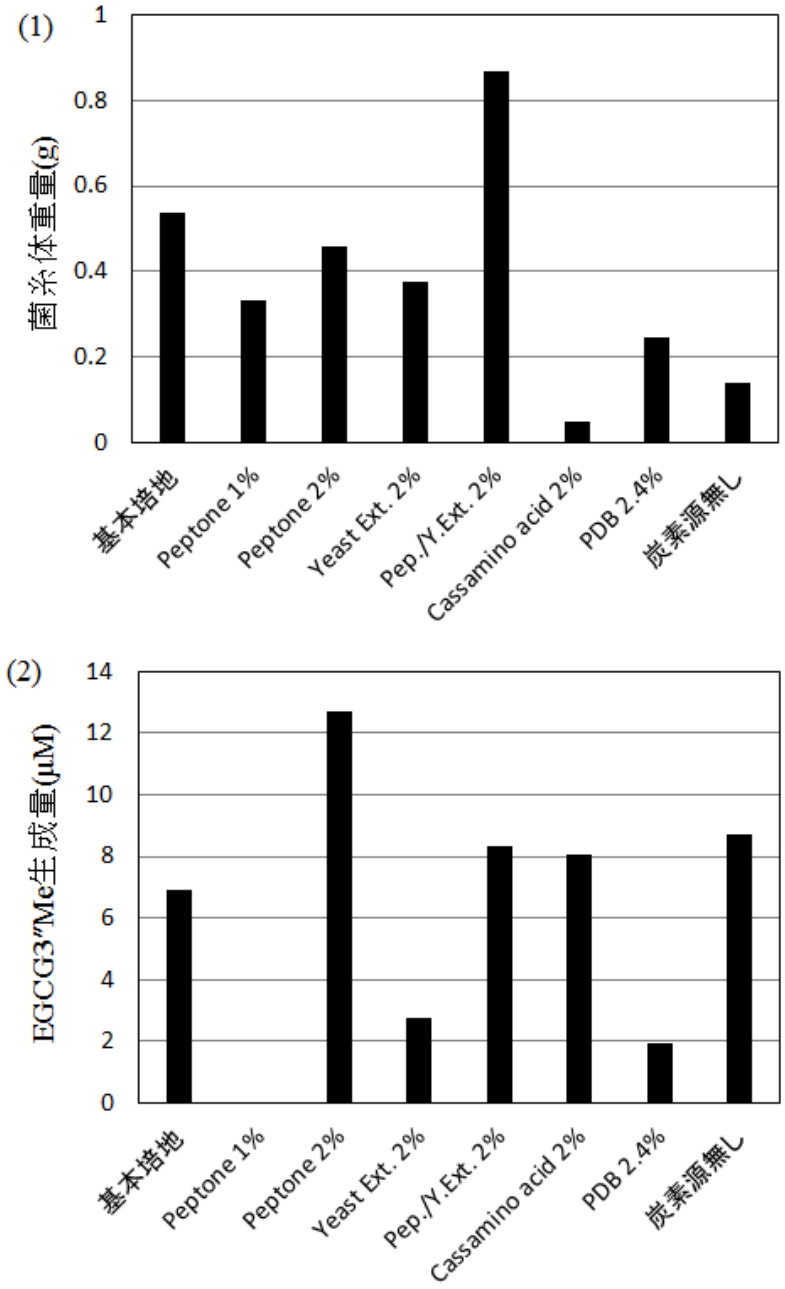


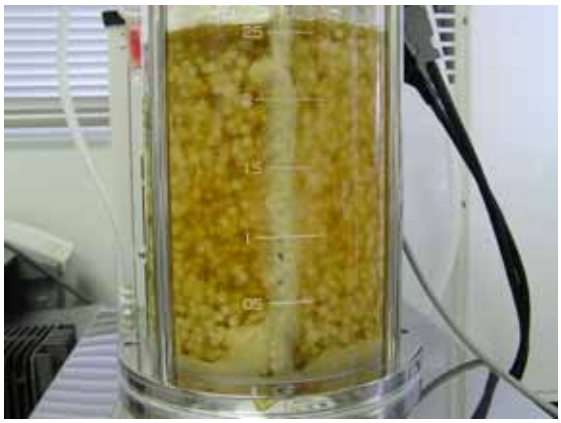
図 4-4. 窒素源の違いによる酵素活性の変化

(1)窒素源の違いによる菌糸体重量の変化。(2)窒素の違いによる酵素活性の変化。基本培地中 (pH5.5) の窒素源である Peptone と Yeast Extract の組成を変更することで、菌糸体の増殖及び酵素活性を比較検討した。酵素活性測定は菌糸体 1 mg 辺りの EGCG3″Me 生成量を指標とした。

４－３－４．ジャーファーメンターを用いた菌糸体培養方法の検討

㈱三ツワフロンテック社製のジャーファーメンターを用いて、攪拌翼に HS-100 又はディスクタービン翼を用いた。その結果、HS-100 攪拌翼で 30 rpm、通気量 0.67 vvm で培養した場合に、培地全体にペレット状の菌糸体を増殖させることができた (図 4-5 (1)、(2))。菌糸体の回収量は 11.2 g 得ることができ、酵素活性は 6.8 μM の EGCG3″Me 生成量であった。また、ディスクタービン翼を用いた場合でも同じ攪拌数と通気量では、ほぼ同じ酵素活性が得られ、攪拌翼の差は見られなかった。

(1)



(2)



図 4-5. 5 L ジャーファーメンター培養の様子

(1)増殖した菌糸体の様子、(2) ペレット状の菌糸体の様子。ジャーファーメンターは㈱三ツワフロンテック社製を用いて検討した。培地は 3 L の張り込みで行い、5 日間培養した。三角フラスコで約 5 日間培養した菌糸体培養液 60 mL を植菌した。攪拌翼は HS-100 型又はディスクタービン型を用いた 。

４－３－５．90 L培養タンクを用いた検討

工業スケールでの培養を見据えた場合、5 L ジャーファーメンターよりさらに大きい培養タンクスケールで、その再現性を検討する必要がある。そのため、90 L タンクを用いて基本培地 (pH5.0) 60 L 張り込みで検討を行った (図 4-6)。攪拌翼にディスクタービンと HS-100 の二種類を用い、その比較も検討した。結果、菌糸体重量はディスクタービン翼を用いた場合では 171.0 g (60 L 換算)、HS-100 では 154.8 g であった。酵素活性は同様にそれぞれ 18.6 μM、19.5 μM であり、良好な結果であった。これまでの培養スケールの違いによる比較を表 4-1 に示した。



図 4-6.菌糸体を培養した 90 L 培養タンク

90 L 培養設備は㈱三ツワフロンテック社製のものを使用した。培地組成は基本培地を用いて 60 L 調製して張り込み、回転数 19 rpm、通気量 0.5 vvm、24℃で 5 日間培養した。培養タンク 2 機を使用し、一方は攪拌翼にディスクタービン、もう一方には HS-100 を用いて比較検討した。

表 4-1.培養スケールの違いによる菌糸体重量及び酵素活性の比較

指標	フラスコ100 mL培養	ジャー3 L培養	培養タンク60 L培養	
			ディスク翼	HS-100翼
菌糸体重量[1] (g)	0.5	0.37 (11.2)	0.29 (171.0)	0.26 (154.8)
EGCG3″Me生成量[2] (μM)	6.8	6.8	18.6	19.5

1)培養液100 mL辺りの凍結乾燥後の重量。( )内は培養液全体の重量
2)生成量凍結乾燥後の菌糸体1 mg辺りのEGCG3″Meの生成量

４－３－６．至適 pH 及び至適温度

EGCG を粗酵素液と反応させ、生成したメチル化カテキンを指標に至適 pH 及び温度を確認した。その結果、至適 pH は、pH6.5-8.5 の範囲で酵素の活性を確認できた (図 4-7 (1))。また、至適温度は 20‐42℃の範囲であることが確認された (図 4-7 (2))。一方 42℃以降は急激に酵素活性の減少が見られた。それぞれの反応 pH と温度の違いによる EGCG3"Me、EGCG4"Me、EGCG3",5"diMe の生成比率に変化は見られなかった。

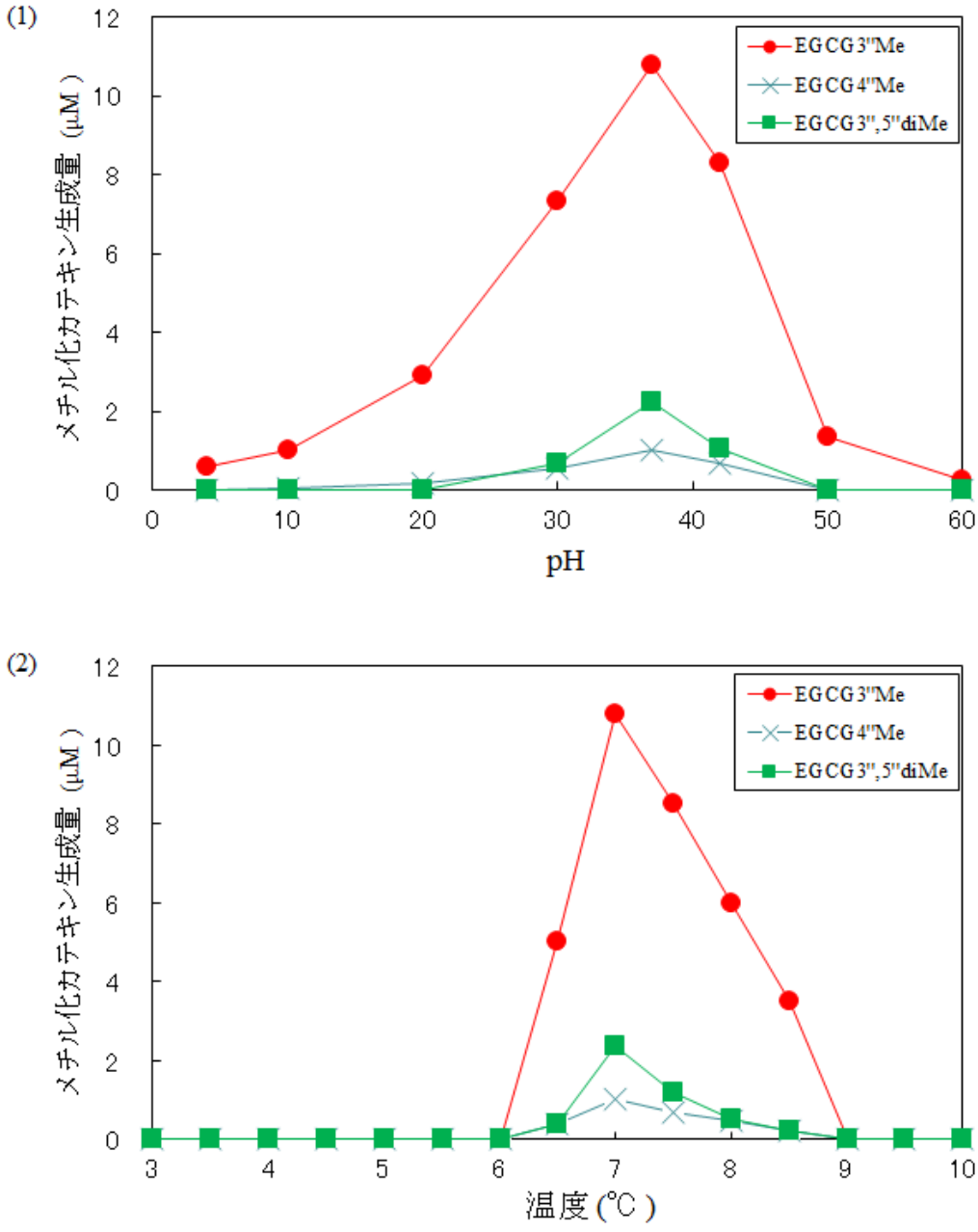


図 4-7. Fv-OMT の至適 pH (1) と至適温度 (2)

酵素活性は EGCG3″Me,、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe の生成を指標に示した。至適 pH 測定の場合は pH3-10 の範囲で測定し、酵素反応は 37℃、6 時間で行なった。至適温度測定の場合は 20 mM リン酸 buffer (pH7.0) を用い、6 時間反応で行なった。反応終了後のメチル化カテキン量を HPLC で分析した。

４－３－７．酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

菌糸体培養物抽出粗酵素では、第 2 章で評価した組換え酵素と比較して活性が低いことから、720 分後まで反応を行った(図 4-8、表 4-2)。反応 5 分後から EGCG3″Me の生成が確認でき、480 分後に最大生成量を示した。EGCG4″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3″,4″diMe は反応 120 分後から生成を確認でき、EGCG3″,5″diMe は 720 分後まで穏やかに生成量が増加した。一方、EGCG4′,3″,5″triMe の生成は、720 分後まで確認できなかった。

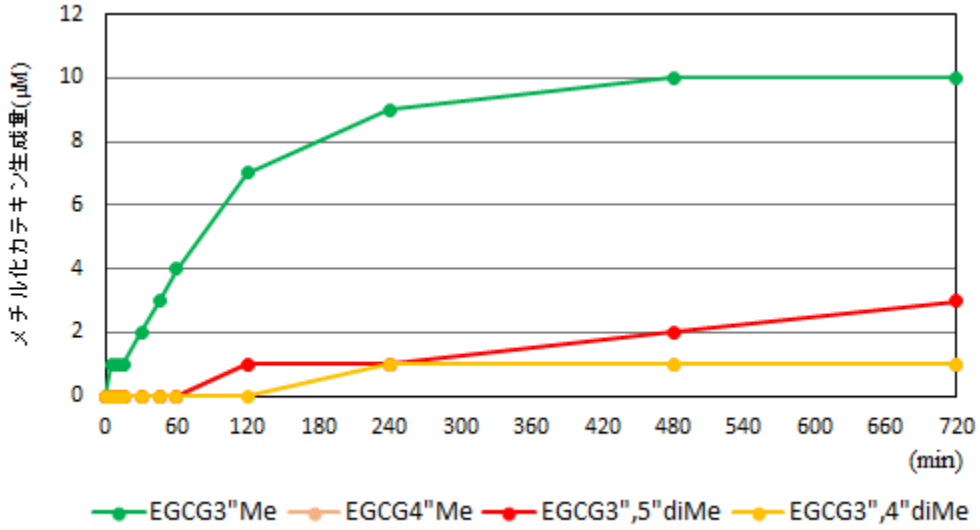


図 4-8. 培養菌糸体抽出粗酵素反応によるメチル化カテキン生成物の経時的変化

酵素反応の組成は 100 mM Tris-HCl (pH7.4)、0.05 mM EGCG、2.5 mM $MgCl_2$、0.05% アスコルビン酸、0.5 mM SAM 溶液を用いた。粗酵素は、反応液 3 mL に対して 0.25 mL 加えた。反応液量をスケールアップし、経時的にサンプリングし、測定した。

表 4-2. 培養菌糸体抽出粗酵素反応メチル化カテキン生成物の経時的変化

(μM)

化合物	0	5	10	15	30	45	60	120	240	480	720	(min)
EGCG3"Me	0	1	1	1	2	3	4	7	9	10	10	
EGCG4"Me	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
EGCG3",5"diMe	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	3	
EGCG3",4"diMe	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
EGCG4',3",5"triMe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
EGCG	55	54	54	54	47	45	44	40	33	28	23	

各メチル化カテキンの経時的生成濃度を数値で示した。

4－4. 考察

エノキタケ菌糸体の工業スケールでの培養が可能かを見極めるために、始めに三角フラスコのスケールで基本的な培地組成の把握を行った。pH を 4.5 から 8 までの範囲で検討したが、菌糸体の増殖と酵素活性に大きな差は見られなかった。炭素源の比較を行った場合では、スクロースを用いた場合で基本培地と比較して菌糸体の増殖と酵素活性ともに良い傾向を示した。特に菌糸体の増殖に関しては、炭素源の違いに差が見られた。窒素源の検討では、Peptone の量を増やすことで、増殖と活性が高まる傾向を示した。一方、Yeast Extract のみを増やしても、増殖と活性はやや低下傾向を示した。

ジャーファーメンター培養の検討では、回転数を 250 rpm とし、通気量 3 vvm、20℃で培養検討した。その結果、三角フラスコ培養時には菌糸体はペレット状で増殖していたが、この条件では全く見られず、細かく剪断された状態であった。菌糸体を回収して酵素活性を測定したが、活性は得られなかった。次に攪拌翼をディスクタービン翼へ変更し、回転数を 200 rpm へ変更して同様に培養を検討した。菌糸体はペレット状のものがわずかに確認されたが、ほとんどは細かく剪断された状態であった。このわずかに得られたペレット状の菌糸体を回収して酵素活性を測定したところ、三角フラスコで培養した時とほぼ同程度の値を得ることができた。そのため、ペレット状の菌糸体を形成させながら培養することが最も重要であることが判明した。回転数を上げると菌糸体は剪断されてしまい、仮に増殖したとしても酵素活性は得られなかった。しかし、回転数があまりにも低すぎると個々のペレットが単に大きくなる傾向にあり、十分な菌糸体の増殖を得ることは出来なかった。つまり、ペレットが小さい状態では剪断することなく、ある程度の大きさになってからは、ペレットから伸びてきた菌糸の先端を剪断することが重要であることが解った。これにより、剪断された菌糸は再びペレット状に増殖し、培地中に十分に蔓延した状態で増殖が可能になった。

ジャーファーメンターでの培養結果をもとに、90 L 培養タンクを用いて、培地 60 L の張込みで培養を検討した。撹拌数は、ジャーファーメンターの撹拌数から算出して

19 rpm とした。その結果、培養中の菌糸体は、ペレット状の状態で増殖した。攪拌翼の違いによる菌糸体の重量と酵素活性は、ほぼ同程度であった。一方、培養スケールが大きくなるにつれて菌糸体重量が低下する傾向を示したが、酵素活性に関しては、逆に良好な結果な得ることが出来た。以上のことから、エノキタケの菌糸体培養に関して三角フラスコから 90 L タンクス培養まで問題なくスケールアップすることができ、良好な菌糸体の増殖及び酵素活性を得ることができた。菌糸体の培養に関して最も重要なことは、適度の剪断性を付与しつつ、ペレット形状を保ったまま増殖させることが、良好な増殖と高酵素生産に大きく繋がることが判明した。90 L 培養タンクのサイズで培養できたことは、この先の工業スケールでの培養を見据えた場合に、培養できる可能性が高いことを意味している。これにより、本研究の目的でもあるメチル化カテキンの工業生産及び安定生産の可能性を示すことが出来た。

エノキタケを培養した菌糸体から粗酵素を抽出し、至適 pH と温度を評価した。大腸菌を用いて発現させた組換え酵素の至適 pH は 6.5 であり、培養菌糸体から抽出した粗酵素では pH7.0 と若干の違いが認められた。また、至適温度は組換え酵素の 40-50℃に対して、エノキタケから精製した粗酵素では 37℃であった。この抽出粗酵素を用いてメチル化カテキン生成物の経時的変化を検討した。酵素反応 720 分後では EGCG3″Me の生成量が最も多く、10 μM であった。次いで EGCG3″,5″diMe が 3 μM、EGCG4″Me と EGCG3″,4″diMe がそれぞれ 1 μM であり、合計 15 μM のメチル化カテキンが生成できた。EGCG4′,3″,5″triMe の生成は 720 分後でも確認できなかった。一方、酵素反応では残存量の EGCG 23 μM に対して EGCG3″Me が 43.5%、EGCG3″,5″diMe が 13%、EGCG4″Me と EGCG3″,4″diMe がそれぞれ 4.3%であり、メチル化カテキン類合計で 65.2%の含量であった。そのため、EGCG3″Me と EGCG4″Me に加え、より優位性のあるチル化カテキン、EGCG3″,5″diMe へ変換できた。将来的には、相乗効果による、より強い抗アレルギー活性を示す可能性のある食品素材への展開が期待できる。

第５章
新規メチル化カテキンの活性評価

５－１．緒言

茶から単離した CsOMT 酵素を用いて EGCG と反応させた結果、これまで報告のある EGCG3″Me と EGCG4″Me の生成を確認でき、さらに新な位置がメチル化された EGCG3″,5″diMe と EGCG3′,3″,5″triMe の生成も確認できた。そのため、これらの活性を評価した。まず始めにマウスを用いて予備検討であはるが、EGCG3″,5″diMe の毒性試験を行った。次にメチル化カテキンの主活性であるヒスタミン遊離抑制効果をマウスマスト細胞を用いて検討した。評価には、EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe を用いた。また、メチル化カテキンの良好なアレルギー抑制効果を示す要因の一つとして、その良好な血漿中への移行性が上げられる。そのため、血漿中への移行性を検討するために、その指標の一つである化合物の脂溶性を評価するオクタノール/水分分配係数を測定し、メチル基の修飾によってどの程度増すかを比較した。一方、EGCG の主要な機能性である DPPH (ジフェニルピクリルヒドラジル) ラジカル消去活性による抗酸化力及び抗菌活性に関して検討した。特にポリフェノールには、抗酸化力によって抗アレルギー活性を示すという報告もされていることから、評価を行った[50]。これらの検討により、メチル基の修飾部位とその数がそれぞれの活性にどのように影響を与えているかを EGCG と比較することで、構造活性相関を明らかにした。

５－２．実験材料及び方法

５－２－１．試薬及び試料

High Performance Liqud Chromatography (HPLC) 分析に使用したアセトニトリル及びメタノールは HPLC 分析用のものを使用し、それ以外は特級グレードのものを使用した。EGCG3″Me、EGCG4″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe は第２章にて単離、精製したものを使用した。

５－２－２．マウスを用いた EGCG3″,5″diMe 毒性試験予備検討

新規メチル化カテキン、EGCG3″,5″diMe の毒性を予備検討として確認した。試験開始時 4 週令の雄性 ddY/slc マウス (日本エスエルシー㈱) を用いた。EGCG3″,5″diMe を生理食塩水に溶解し、25、50、100 mg/kg の容量で、20 時間絶食させた後に単回で強制経口投与した。マウスは一群 10 匹用いた。投与後は飼料を自由摂取させ、14 間にわたり行動、外観の異常の有無及び体重を確認した。14 日後にナウスをと殺し、剖検と臓器の秤量を行った。臓器は肝臓、膵臓、腎臓、心臓、肺、精巣を秤量した。

５－２－３．ヒスタミン遊離抑制

I 型アレルギーの判定法として、マウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制効果を指標とした。マウスマスト細胞は NC/Nga を用い、10% 非動化 FBS、10% WEHI-3b 培養上清、5 mM グルタミン酸、50 mM 2-メルカプトエタノール添加 RPMI1640 培地で 95% の加湿下、37℃で培養した。細胞 (2 x 10^6 cells/mL) に抗 TNP－マウス IgE 抗体で一晩刺激した後、Tyrode 緩衝液 (Ca^{2+}-free; 10 mM HEPES, pH7.4; Wako Chemical; containing 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.056% NaH_2PO_4, 0.1% glucose, 0.05% gelatin, and 1 μM $MgCl_2/6H_2O$) に浮遊させた後、1 x 10^7cells/mL になるように再度 Tyrode 緩衝液で調製し、各メチル化カテキンを添加して 20 分間 37℃にてインキュベートした。その後 300 ng/mL の TNP-BSA と 300 μM の $CaCl_2$ を加えて 37℃、10 分間にて脱顆粒を誘発した。4 mM

の EDTA を含む Tyrode 溶液を加えた後、氷冷して反応を停止した。ヒスタミン量は、反応液を遠心分離した上清に等量の 0.1N HCl を加えて HPLC (㈱島津製作所製) にて測定した。HPLC は蛍光検出器を用い (ex:330 nm、em:430 nm)、Asahipak-ODP-50-4E カラム (4.6 mm i.d. x 250 mm, particle size: 5 μm、昭和電工㈱) を使用した。移動相は 1 mM オルトフタルアルデヒドと 1 mM N-アセチルシステインを含む 50 nM ホウ酸ナトリウム：アセトニトリルを 80:20 で混合したものを使用し、流速 0.5 mL/min、カラム温度 37℃で測定した。

５－２－４．オクタノール/水分分配係数の測定

EGCG 及び各メチル化カテキン 0.4 mg 又は 0.2 mg に 1-オクタノールを 1 mL、蒸留水 1 mL を加えた。攪拌後 10 mL の試験管へ移した。試験管に 50 mM リン酸バッファー (pH7.4) を 3 mL と 1-オクタノール 3 mL 加えた場合、50 mM リン酸バッファー (pH7.4) を 3 mL と 1-オクタノール 6 mL 加えた場合、50 mM リン酸バッファー (pH7.4) を 6 mL と 1-オクタノール 3 mL 加えた場合の 3 種類を調製し、5 分間転倒攪拌した。遠心分離後のリン酸バッファー層中及び 1-オクタノール層中のカテキン濃度を吸光度系の波長 280 nm で測定し、オクタノール/水分分配係数 (log *Po*/*w*) を下記の式より算出した。各 3 回測定し、平均値±SD を求めた。

log *Po*/*w*=1-オクタノール層中の吸光度の値/水層中の吸光度の値

５－２－５．ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性

EGCG、ECG 又はメチル化カテキン (EGCG3″Me、EGCG4″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe) を 0.0078, 0.0156, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 mg/mL の濃度に調整した。各カテキン 100 μL に 0.75 mM DPPH を 100 μL 添加し、室温で 15 分間静置し

た。その後 517 nm の吸光度を測定した。蒸留水を加えた場合の吸光度値を 0%として DPPH ラジカル消去活性の IC_{50} を下記の計算式より算出した。IC_{50} の値(mg/mL) は、結果ではモルに換算して示すこととした。

DPPH ラジカル消去能(%)＝[(１－供試物質の吸光度)/ コントロールの吸光度] × 100

５－２－６．抗菌活性

本試験は、財団法人北里環境科学センターに委託して行った。試験品として EGCG もしくはメチル化カテキン (EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe) の細菌に対する最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration、MIC) を測定した。各メチル化カテキンは「２－２－５」と同様に分取した物を用いた。作用濃度は 30, 63, 125, 250, 750, 1500 μg/mL を用いた。試験菌は下記の 5 菌を用いた。

① *Staphylococcus aureus* (NBRC12732) ：黄色ブドウ球菌

② *Escherichia coli* (NBRC3972) ：大腸菌

③ *Salmonella enterica subsp.enterica* (IFO3313(=NBRC3313)) ：サルモネラ菌

④ *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC13275) ：緑膿菌

⑤ *Legionella pneumophilia* (ATCC33153) ：レジオネラ菌

試験菌①～④は Muller Hinton Ⅱagar にて 35℃、一晩培養した後、発育菌を Mueller Hinton Broth に接種し、35℃で 20 時間培養した。この菌液を再度 Mueller Hinton Broth に接種し、35℃で 20 時間培養した。最終培養菌液を Mueller Hinton Broth を用いて希釈し、菌濃度約 10^5CFU/mL に調製した。試験菌⑤は BCYEα 寒天培地 (日研生物) に塗布し、35℃で 3 日間培養した。発育した菌を滅菌水に懸濁し、菌濃度を約 10^6CFU/mL に調製した。

試験品は、90 mg を 0.6 mL の DMSO に溶解した。これらの試験品を所定濃度にさらに DMSO で調製し、0.1 mL を寒天培地に添加混合した。寒天培地中の試験品濃度は 30,

63, 125, 250, 750, 1500 μg/mL とした。試験菌①～④は Muller Hinton Ⅱ agar を、試験菌⑤は Legionella agar (Base:Difco、Enrichment:Difco) を用いた。試験菌を白金耳で上記寒天培地に塗布し、試験菌①～④は 35℃で 20 時間、試験菌⑤は 35℃で 1 週間培養した。培養後に発育の見られない最小濃度をもって MIC とした。

５－３．結果

５－３－１．マウスを用いた EGCG3″,5″diMe 毒性試験予備検討

マウスの体重を投与前、投与 2、7、11、14 日後に測定した結果、いずれの投与量群に関しても順調に増加し、対照群と差は見られなかった (表 5-1)。また行動、外観の観察に関しても、いずれの投与群で異常は見られなかった。投与開始 14 日後にと殺し、肝臓、膵臓、腎臓、心臓、肺及び精巣の秤量を行った結果、対照群と比較していずれの臓器に関しても差は認められなかった。以上のことから、EGCG3″,5″diMe は 100 mg/kg までの試験条件下では毒性は認められなかった。

表5-1. マウスを用いたEGCG3″,5″diMe毒性試験予備検討

体重（g）

	投与前（※）	投与2日後	投与7日後	投与11日後	投与14日後
対照	20.6 ± 0.3	25.4 ± 0.4	29.4 ± 0.4	34.4 ± 0.5	35.9 ± 0.5
25mg/kg	20.6 ± 0.1	25.1 ± 0.3	30.1 ± 0.6	34.6 ± 0.6	36.5 ± 0.6
50mg/kg	21.0 ± 0.1	25.2 ± 0.3	30.3 ± 0.6	33.7 ± 0.6	35.5 ± 0.6
100mg/kg	20.6 ± 0.1	25.3 ± 0.3	29.3 ± 0.5	33.9 ± 0.7	35.7 ± 0.6

試験群間で有意差なし（Dunnett検定）

臓器重量（g、14日目）

	肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肺	精巣
対照	2.11 ± 0.04	0.123 ± 0.005	0.556 ± 0.023	0.145 ± 0.005	0.188 ± 0.005	0.215 ± 0.008
25mg/kg	2.03 ± 0.04	0.134 ± 0.006	0.533 ± 0.022	0.143 ± 0.005	0.196 ± 0.005	0.199 ± 0.007
50mg/kg	1.97 ± 0.04	0.116 ± 0.006	0.535 ± 0.024	0.141 ± 0.006	0.193 ± 0.005	0.217 ± 0.008
100mg/kg	2.05 ± 0.04	0.120 ± 0.006	0.518 ± 0.021	0.141 ± 0.006	0.190 ± 0.004	0.198 ± 0.007

試験群間で有意差なし（Dunnett検定）

臓器重量・体重比（%、14日目）

	肝臓	脾臓	腎臓	心臓	肺	精巣
対照	5.88 ± 0.08	0.344 ± 0.015	1.55 ± 0.06	0.403 ± 0.016	0.524 ± 0.013	0.601 ± 0.022
25mg/kg	5.55 ± 0.08	0.366 ± 0.015	1.46 ± 0.06	0.392 ± 0.017	0.539 ± 0.013	0.549 ± 0.020
50mg/kg	5.55 ± 0.08	0.325 ± 0.015	1.51 ± 0.06	0.397 ± 0.018	0.544 ± 0.012	0.614 ± 0.023
100mg/kg	5.74 ± 0.07	0.336 ± 0.015	1.46 ± 0.05	0.395 ± 0.018	0.534 ± 0.006	0.556 ± 0.021

試験群間で有意差なし（Dunnett検定）

５－３－２．ヒスタミン遊離抑制

EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe、EGCG3′,3″,5″triMe のマウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制の効果を検討した。なお EGCG4″Me は生成量が低く必要量が確保できなかったために本試験からは除外した。EGCG を 12.5 μg/mL と 25 μg/mL 添加した場合のヒスタミン遊離抑制率はそれぞれ 22.3%、37.5%であった (図 5-1)。同様に EGCG3″Me は 23.9%、50.9%であり、EGCG3″,5″diMe は 63.8%、73.1%であった。EGCG3′,3″,5″triMe ではそれぞれ 64.4%、73.4%であった。これらの結果からヒスタミン遊離抑制効果は EGCG3′,3″,5″triMe = EGCG3″,5″diMe > EGCG3″Me > EGCG であった。

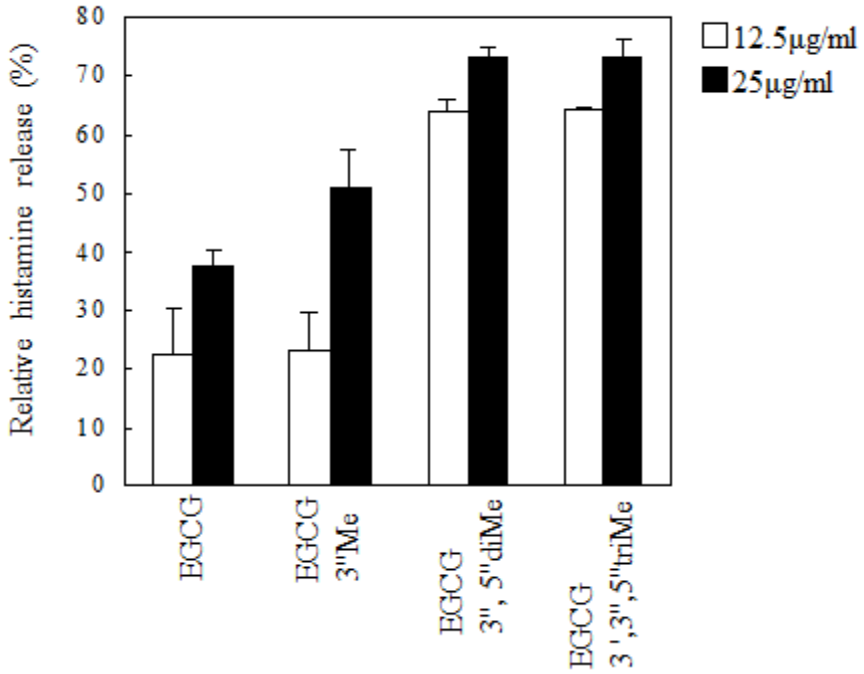


図 5-1. EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe のマウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制の効果

マウスマスト細胞は NC/Nga を用いた。細胞 (2 x 10^6 cells/mL) に抗 TNP－マウス IgE 抗体で一晩刺激した後、Tyrode 緩衝液に浮遊させた後、1 x 10^7cells/mL になるように再度 Tyrode 緩衝液で調製し、各メチル化カテキンを添加して 20 分間 37℃にてインキュベートした。その後 300 ng/mL の TNP-BSA と 300 μM の $CaCl_2$ を加えて 37℃、10 分間にて脱顆粒を誘発した。4 mM の EDTA を含む Tyrode 溶液を加えた後、氷冷して反応を停止した。ヒスタミン量は、反応液を遠心分離した上清に等量の 0.1M HCl を加えて HPLC　にて測定した。図は、コントロールと比較した場合のヒスタミン遊離抑制をパーセンテージで示した。値は n=3 の平均値±SD。

５－３－３．オクタノール/水分分配係数の測定結果

メチル基の増加によって化合物の脂溶性が増すかを確認するため、オクタノール/水分分配係数 (log *Po/w*) を求めた。その結果、EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe、EGCG3′,3″,5″triMe のそれぞれの値は 0.61±0.05 (平均値±SD)、1.04±0.11、1.37±0.13 及び 1.46±0.15 であり、メチル基が増加するにつれて脂溶性が増すことが確認された (図 5-2)。

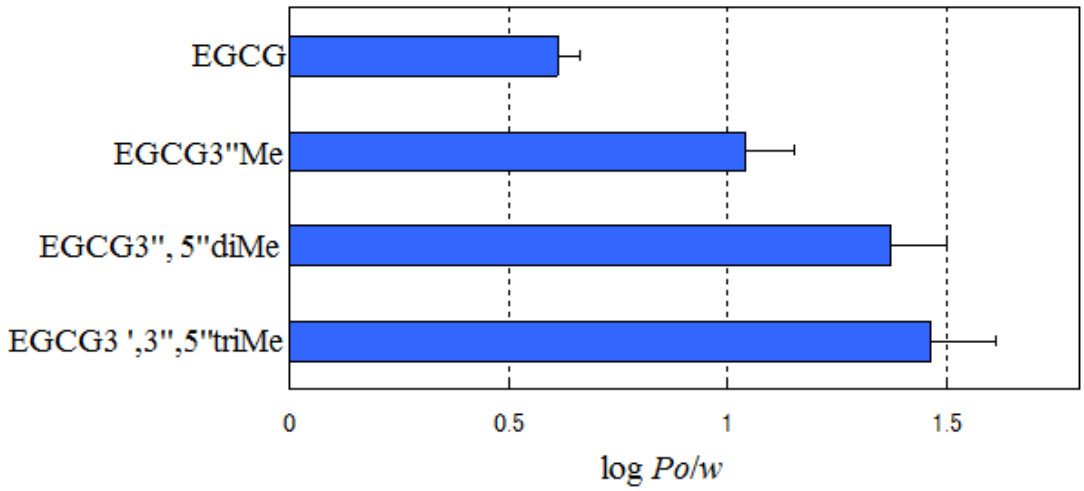


図 5-2. EGCG とメチル化カテキンのオクタノール/水分分配係数の測定結果

EGCG 及び各メチル化カテキン 0.4 mg 又は 0.2 mg に 1-オクタノールを 1 mL、蒸留水 1 mL を加えた。攪拌後 10 mL の試験管へ移した。試験管に 50 mM リン酸バッファー (pH7.4)と 1-オクタノールを加えて調製し、5 分間転倒攪拌した。遠心分離後のリン酸バッファー層中及び 1-オクタノール層中のカテキン濃度を吸光度系の波長 280 nm で測定し、オクタノール/水分分配係数 (log *Po/w*) を求めた。値は n=3 の平均値±SD。

５－３－４．ジフェニルピクリルヒドラジル (DPPH) ラジカル消去活性

各種カテキン及びメチル化カテキンの DPPH ラジカル消去活性を測定し、IC_{50} を算出して抗酸化力を評価した (表 5-2)。その結果、EGCG は 14.7 μM、ECG は 20.1 μM、EGCG3″Me は 25.1 μM、EGCG4″Me は 42.7 μM、EGCG3″,5″diMe は 36.1 μM、そして EGCG3′,3″,5″triMe は 50.7 μM であった (IC_{50} の値(mg/mL) をモルに換算して示した)。これらのことから EGCG が最も高い活性を示した。

表5-2. DPPH ラジカル消去活性

Compounds	IC_{50} (μM)
EGCG	14.7
ECG	20.1
EGCG3''Me	25.1
EGCG3'',5''diMe	36.1
EGCG4''Me	42.7
EGCG 3',3'',5''triMe	50.7

各カテキン 100 μL に 0.75 mM DPPH を 100 μL 添加し、室温で 15 分間静置した。その後 517 nm の吸光度を測定した。蒸留水を加えた場合の吸光度値を 0%として DPPH ラジカル消去活性の IC_{50} を下記の計算式より算出した。

DPPH ラジカル消去能(%)＝[(１－供試物質の吸光度)/ コントロールの吸光度] × 100

５－３－５．抗菌活性

EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe の抗菌活性を評価するために、*S.aureus*、*E.coli*、*S.enterica subsp.enterica*、*P.aeruginosa* 及び *L.pneumophilia* の細菌に対する MIC を評価した。なお EGCG4″Me は生成量が低く必要量が確保できなかったために本試験からは除外した。その結果、各 5 細菌に対して EGCG は最も高い抗菌活性を示し、特に *S.aureus* に対しては MIC 125 μg/mL と最も強い効果を示した (表 5-3)。EGCG3″,5″diMe は *E.coli* に対して 1500 μg/mL でも効果を示さず、EGCG3′,3″,5″triMe は *E.coli* 、*S.enterica subsp.enterica* 及び *P. aeruginosa* に対して 1500 μg/mL でも効果が得られなかった。

表5-3. EGCGとメチル化カテキンの抗菌活性の比較

Bacteria Strains	MIC (μg/mL)			
	EGCG	EGCG3″Me	EGCG3″,5″diMe	EGCG3′,3″,5″triMe
Staphylococcus aureus	125	125	250	750
Escherichia coli	750	1500	>1500	>1500
Salmonella enterica subsp. enterica	250	750	750	>1500
Pseudomonas aeruginosa	750	750	750	>1500
Legionella pneumophila	250	750	750	750
Propionibacterium acnes	750	1500	1500	1500

5－4. 考察

新規メチル化カテキンの EGCG3″,5″diMe 毒性を確認した結果、予備試験ではあるが、100 mg/kg の投与で毒性は認められなかった。そのため、将来はより活性の強い抗アレルギー素材としての展開が期待できる結果であった。

EGCG、EGCG3″Me、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe のマウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制の効果を検討した。本試験での EGCG3″Me の結果は、マウスマスト細胞[17]及び好塩基球性細胞 KU812[19]からのヒスタミン遊離抑制効果を評価した報告と同様に、強い抑制効果を示した。一報で EGCG3″,5″diMe 又は EGCG3′,3″,5″triMe の抗アレルギー活性に関する報告は無い。今回、本研究では初めて EGCG のメチル基の修飾数の違いによるヒスタミン遊離抑制を評価した。その結果、ヒスタミン遊離抑制効果は EGCG3′,3″,5″triMe = EGCG3″,5″diMe > EGCG3″Me > EGCG の順であり、メチル基の修飾数が増えるにつれて抑制効果は増加したが、2 ヵ所と 3 ヵ所が修飾した場合では、ほぼ同程度であった。EGCG3″,5″diMe は EGCG3″Me よりも強い抑制効果を示したことから、ガロイル基の 5 位のメチル基の修飾は、その抑制効果を強めることが示唆された。そのため、EGCG3″,5″diMe は EGCG3″Me 及び EGCG4″Me よりも強い抗アレルギー活性を示す優位性のあるメチル化カテキンであることが判明した。一方、EGCG3″Me と EGCG4″Me を用いた場合のヒスタミン遊離抑制効果を検討した報告では、抑制効果はほぼ同程度であったことから[17]、ガロイル基ではメチル基の修飾部位よりも数が重要であることが明らかとなった。EGCG3′,3″,5″triMe は EGCG3″,5″diMe とほぼ同程度の抑制効果を示した。このことから、EGCG の B 環のメチル基の修飾はそれほど抑制効果に寄与せず、少なくとも 3 位には、その効果は少ないことが判明した。

EGCG の活性の一つに抗癌作用が報告されている[4]。近年癌細胞を用いた研究において、EGCG に対するレセプターである 67kDa ラミニンレセプター (67LR) が同定された[51]。67LR は細胞膜タンパク質であり、67LR に対する抗体で処理した癌細胞に EGCG を作用させると、その癌細胞の増殖抑制は阻害された。さらにヒト好塩基球細胞株

KU812 を用いた報告で、EGCG は extracellular signal-regulated kinese1/2 (ERK1/2) のリン酸化を抑止し、FcεRI の発現を抑制した[52]。FcεRI はα、β及び 2 つのγ鎖からなる 4 量体であり、EGCG はαとγの mRNA 発現を抑えた[19]。FcεRI はアレルギー反応の鍵となる IgE に対する親和性レセプターであり、細胞表面に局在している[53][54]。また、EGCG は KU812 細胞において、ミオシンⅡ調節軽鎖 (Myosin Ⅱ regulatory light chain、MRLC) のリン酸化を抑制し、ヒスタミンの遊離を抑制した[55][56]。さらに EGCG は 67LR に結合した後、eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) を介してミオシンホスファターゼ調節サブユニット 1 (myosin phosphatase targeting subunit 1、MYPT1) のリン酸化を抑制することが判明した[57]。よって EGCG は 67LR に結合した後、ERK1/2 のリン酸化を抑制し、FcεRI の発現を抑制することで IgE の結合を阻害している。また、eEF1A を介して、MYPT1 のリン酸化を抑制する。これによって、その下流の MRLC のリン酸化も抑制している。一方、抗酸化活性を有するオリゴノール (フェノール性化合物の混合物、カテキン、EC、EGC 及び EGCG を 16%含む) を MDCK (Mandin-Darby canin kidney) 細胞に作用させた結果、活性酸素 (Reactive Oxygen Species、ROS) の産生を抑制し、さらに ERK1/2 のリン酸化を抑制した[50]。ROS の産生は MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路を活性化させることで ERK1/2 のリン酸化を促進させることが報告されている[58]。よって抗酸化活性を有する EGCG はこの経路によっても FcεRI の発現を抑制していると考えられる。また、雄の ddy マウスをによる PCA 反応試験を行った報告では、EGCG3″Me と EGCG4″Me は EGCG よりもアレルギー反応を優位に抑えた[17]。さらにマウスマスト細胞を用いた試験では、これらのメチル化カテキンは EGCG と比較してヒスタミンやロイコトリエンの遊離抑制、サイトカインの産生と分泌を抑制し、さらには細胞内の IgE 情報伝達系に関わるチロシンキナーゼ (Lyn、Syk、Bruton's tyrosine kinase)のリン酸化を直接に阻害することが判明した[17]。

67LR に EGCG が結合すると、癌細胞である MM (Multiple Myeloma) 細胞中の一酸化窒素構成酵素 (eNOS) のリン酸化を誘発し、一酸化窒素 (NO) 産生、cGMP (Cyclic

guanosine monophosphate) が活性化される報告がある[59]。cGMP は RhoA (Ras homologus gene family member A) のリン酸化を抑制し、さらに Rho キナーゼの活性を抑制する。この Rho キナーゼは、MRLC へのリン酸化を抑制する[60]。そのため、EGCG は 67LR を介したこの経路によっても MRLC のリン酸化を抑制するものと思われる。MRLC のリン酸化抑制は、細胞骨格の再形成及び局在に影響を及ぼしている[61]。さらに分泌顆粒の細胞近傍への移動や細胞膜への融合に関与していることが知られている[62]。そのため EGCG による MRLC のリン酸化抑制がヒスタミンの遊離抑制に関与しているものと推察される。

また、IgE が FcεRI に結合すると小胞体からカルシウムが分泌され、これを感知した STIM1 (atromal interaction molecule 1) が発現し、細胞内にカルシウムが流入する[63]。これによって分泌顆粒が細胞膜に移動し、ヒスタミンを遊離する。EGCG によって FcεRI の発現が抑制されることは、細胞内へのカルシウムの流入が妨げられ、ヒスタミン遊離抑制に繋がることが示唆された。これらの様々な経路を複合的に抑制し、EGCG はヒスタミン遊離を抑制すると思われる。これらの経路において、EGCG と EGCG3″Me を直接比較した報告では以下の通りである。

・67LR への結合：EGCG> EGCG3″Me[52]

・ERK1/2 のリン酸化抑制：EGCG> EGCG3″Me[52]

・FcεRI の発現抑制：EGCG> EGCG3″Me[19]

・FcεRI の α 鎖の発現抑制：EGCG＜EGCG3″Me[19]

・FcεRI の γ 鎖の発現抑制：EGCG=EGCG3″Me[19]

・ヒスタミン遊離抑制：EGCG＜EGCG3″Me[20][19]

EGCG と EGCG3″Me による 67LR への結合、ERK1/2 のリン酸化抑制及び FcεRI の発現抑制では、作用部位によって差が見られた。しかしヒスタミンの遊離に関しては、EGCG の方が抑制した。細胞を用いた EGCG と EGCG3″Me の比較は少なく、EGCG3″,5″diMe、EGCG3′,3″,5″triMe を用いた比較は、本研究が初めてである。今後、これらの新規メチ

ル化カテキンを用いて、細胞のレセプターへの結合能や遺伝子の発現、タンパク質の発現やリン酸化の抑制等を詳細に検討する必要がある。これらの考察を図 5-3 に示す。

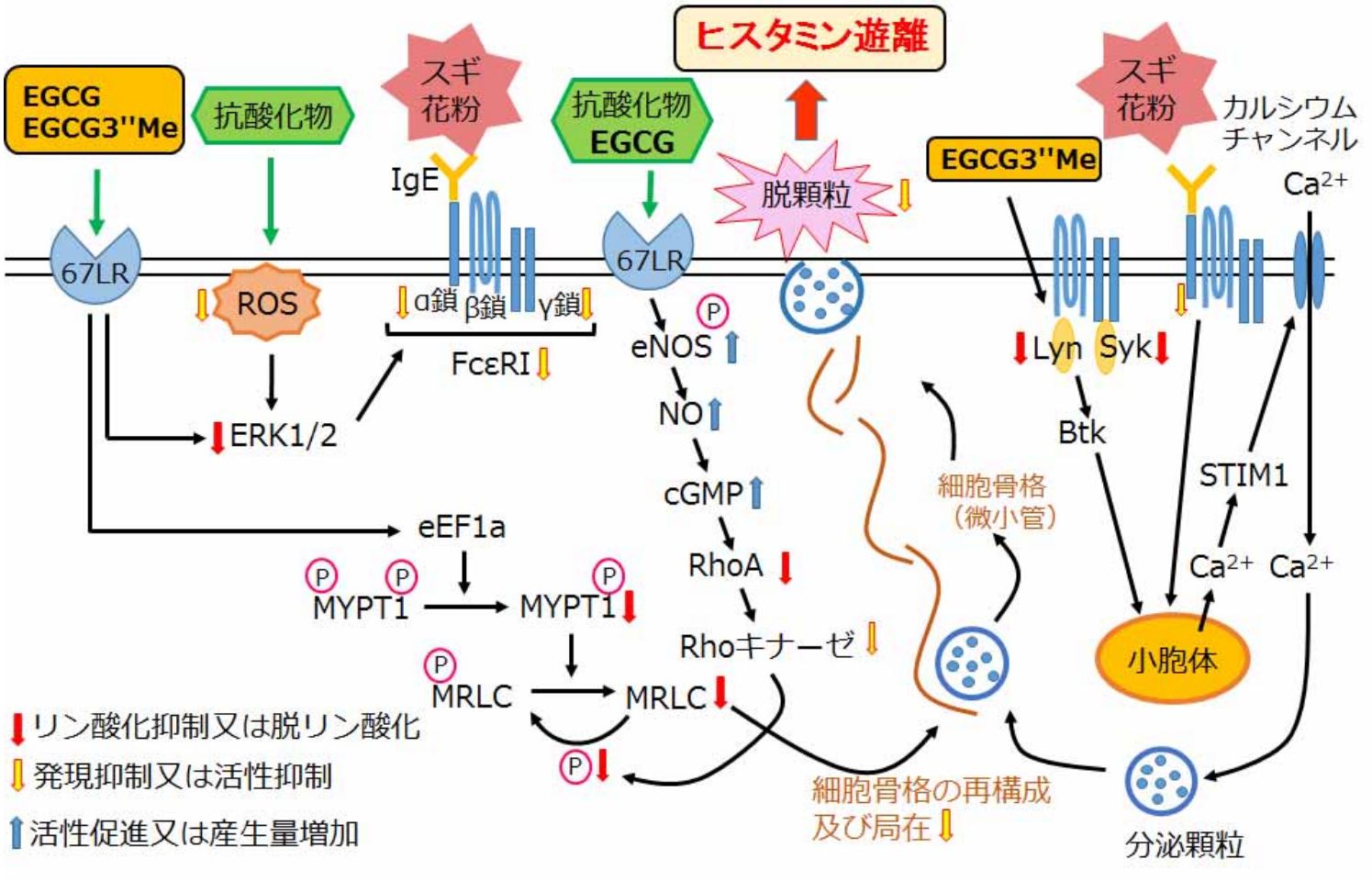


図5-3. EGCG及びEGCG3″Meのスギ花粉に対するヒスタミン遊離抑制のメカニズム

メチル化カテキンの体内動態に関する報告ではEGCG3″Meをマウスへ経口投与した場合の血漿濃度は約9倍

高い値を示した[22]。また、べにふうき緑茶 (EGCG43.5 mg、EGCG3″Me 8.5 mg 含有) を人へ摂取させた場合の血漿中AUC濃度はEGCGの8.48 mgに対してEGCG3″Meは6.72 mgと高い値を示した[24]。これらことから、EGCG3″,5″diMe、EGCG3′,3″,5″triMeは血漿中への良好な移行性が期待できた。化合物が腸から吸収されるには、その膜を通過する必要がある。腸の膜は脂質二重膜で構成されており、脂溶性の高い化合物ほど通過しやすくなっている。そのためEGCG及びメチル化カテキンの脂溶性を評価するためにオクタノール/水分分配係数を測定した。その結果、メチル基の数が増えるにつれて、脂溶性は増加する結果であった。これによってメチル化カテキンはEGCGよりも良好な血漿中への移行性が期待できることが示唆された。さらに血漿中で安定であることが*in vivo*でEGCGよりも強い抗アレルギー活性を示した大きな要因であると考えられた。一方、良好な血漿中濃度を示したEGCG3″Meは、さらに代謝消失も穏やかであった[24]。他のポリフェノールのメチル化体に関しても、同様の研究報告があり、7-ヒドロキシフラボン、7,4′-ジヒドロキシフラボン、クリシン、アピゲニン及びこれらのメチル化体のヒトCaco-2細胞への透過性を比較したところ、メチル化体の方が良好であった[64]。同様にヒト肝臓細胞S9フラクションを用いた安定性試験もメチル化体の方が良好であった[64]。さらにポリフェノールの一種であるクリシンとアピゲニンのメチル化体はヒトのSCCガン細胞の増殖抑制効果に対して、それらの非メチル化体よりも約10倍高い活性を示した[65]。これのことから、メチル化カテキンは良好な血漿中への移行性に加え、代謝も安定性も良好である可能性が示唆された。

次にEGCGの主要な活性の一つであるDPPHラジカル消去能による抗酸化活性をメチル化カテキンと比較し、水酸基またはメチル基が活性にどのように影響を及ぼしているか、構造相関活性を検討した。その結果 EGCG >ECG>EGCG3″Me> EGCG3″,5″diMe> EGCG4″Me> EGCG3′,3″,5″triMeであった。これらの順位から水酸基が

減少するにつれて DPPH ラジカル消去活性が低下する傾向にあった。カテキンなどのフェノール性化合物の場合、一般的にそのフェノール性水酸基がラジカルの消去能に影響を及ぼしていると考えられている。ECG は EGCG3″Me と同じ数の水酸基を有するにも関わらす、EGCG3″Me より強い活性を示した。そのため B 環の水酸基の数の減少はガロイル基と比較して活性に及ぼす影響は少ないことが考えられた。EGCG3″Me と EGCG4″Me では同じガロイル基の水酸基数にも関わらす、異なる活性値を示した。他の報告で EGCG の B 環の 4 位とガロイル基の 4 位の両方の水酸基がグルコシル化した場合、DPPH ラジカル消去活性は減少したが、B 環の 4 位の水酸基のみがグルコシル化した場合は変化が見られなかったことから、ガロイル基の 4 位の水酸基は活性に重要な影響を及ぼしていると述べている[66]。この報告ではガロイル基の 3 位に関する知見は触れていないが、我々の結果での EGCG3″Me、 EGCG3″,5″diMe 及び EGCG4″Me の各 IC_{50} 値を比べると、ガロイル基では 4 位の水酸基が最も消去活性にとって重要であることが示唆された。前述にて EGCG はその抗酸化活性によっても FcεRI の発現を抑制していると考察したが、メチル化カテキンは水酸基の減少によって弱まる傾向であった。そのため、この経路による抑制は、EGCG の方が優位であると思われた。

各種細菌に対する抗菌活性を評価したところEGCGが最も活性を示し、メチル基の数が増すにつれて活性が弱まる結果であった。EGCGの*S.aureus*に対する抗菌活性を評価した文献報告では、MICが250ppm (250 μg/mL)であった[67]。本試験の結果は125 μg/mLであり、ほぼ同程度の濃度を示したことから、再現性が得られたものと考えられた。EGCGが抗菌活性を示すメカニズムとして水酸基のH^+が分離し、結果として過酸化水素を発生させる。この過酸化水素が抗菌活性を示すと言う報告がある[68]。そのために各種カテキンのDPPHラジカル消去活性と抗菌活性は、その水酸基の数に比例して同様の傾向を示したものと思われた。また、ガロイル基の全ての水酸基がメチル化したECGと他のカテキンでの抗酸化活性を測定した報告では、ガロイル基の存在とさらにその水酸基の数が活性を強めるという結果を示している[68]。これらの報告からも、水酸基の数によ

る抗酸化活性の強弱が、抗菌活性に影響を及ぼしていると思われる。

今回単離した CsOMT を用いることによって目的である EGCG3″Me と EGCG4″Me と、さらに新たなメチル化カテキンを生成することが可能となった。生成した各メチル化カテキンを用いてヒスタミン遊離抑制を比較した結果、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe は EGCG3″Me よりも強い抑制効果を示した。また、オクタノール/水分分配係数を測定した結果、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe は、EGCG、EGCG3″Me よりも脂溶性が増すことが確認され、血漿中への良好な移行性が期待できることが示唆された。これらことから、EGCG3″,5″diMe 及び EGCG3′,3″,5″triMe は、強い抗アレルギー効果を示す優位性のあるメチル化カテキンであること判明した。

第 6 章
総括

日本では戦後の復興需要、そして 1960 年以降の急激な都市開発と共に樹木の需要が高まってきた。その対策としてスギの植林が大々的に行われ、スギ花粉の大量飛散に繋がった。この植林が 1970 年以降のスギ花粉アレルギー疾患に悩む患者の急増に対する大きな一因と考えられる。更には環境の変化に伴い、気温の上昇による花粉飛散量の増加にも繋がった。また、その頃の生活スタイルの変化も、その一因と考えられる。対策として薬物治療があるが、副作用も報告されている。このため、副作用が無く日常的に摂取可能な食品成分による予防や症状の軽減が望まれている。

現在の日本において、ポリフェノールに対する認知度は非常に高まっていると言える。その主な要因の一つとして、ポリフェノールの健康や生活習慣病に対する機能性の研究が行われ、その効果に関する多くの報告がなされていることによるものと思われる。そのため、市場を見ればこのポリフェノールの健康に対する訴求を謳った健康食品を多く目にすることができる。

茶は紅茶、ウーロン茶や日本茶など様々な製法の違いによって世界中で古くから飲用されている代表的な飲料である。この茶にも代表的なポリフェノールとしてカテキンが含まれており、その主成分は EC、EGC、ECG や EGCG である。EGCG は乾燥茶葉重量当たりカテキンの 50-60%を占めることから、最も含量が多く、そのために様々な機能性の研究が報告されている。これらのことから、独立行政法人野菜茶業研究所の山本 (当時。現在、農研機構食品研究部門) らは茶に注目し、マウスマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制効果を指標にして、抗アレルギー作用を有する茶の探索を行った[15]。その結果、「べにほまれ」「べにふじ」「べにふうき」などの茶品種に強いヒスタミン遊離抑制効果があることを見出した。関与成分を探索したところ、EGCG のメチル化体である EGCG3″Me と EGCG4″Me であることが特定された[11]。しかしその含量は乾燥茶葉重量当たり 1.5%と微量にしか含まれていない[12]。本研究ではこのメチル化カテキンである EGCG3″Me と EGCG4″Me の生合成酵素を突き止め、この微量にしか含まれないメチル化カテキンを食品素材として提供し、EGCG を基質として酵素

変換による製造が可能かを検討した。また、酵素変換を用いてメチル化カテキンを合成した場合、EGCG3″Me と EGCG4″Me よりも強い抗アレルギー活性を示すメチル化カテキンの生成も検討した。この新たに得られたメチル化カテキンのメチル基の修飾部位や数の違いを比較するとで、その構造と活性の相関も明らかにすることとした。

第２章では、茶「べにふうき」からのメチル化カテキンの生成に関与していると思われる *O*-メチルトランスフェラーゼの遺伝子の単離を試み、735 塩基、推定アミノ酸 245 残基からなる遺伝子を単離した。本遺伝子は、植物のリグニン合成に関与する CCoAOMT[29][30][31]と高い相同性を示した。本遺伝子を大腸菌を用いて発現させて酵素を精製し、EGCG と反応させた結果、EGCG3″Me と EGCG4″Me の生成を確認することができた。そのため本遺伝子を茶から新たに単離した新規 *O*-メチルトランスフェラーゼ遺伝子、*CsOMT* (*Camellia sinensis O*-methyltransferase) とした。また、EGCG3″Me と EGCG4″Me 以外に新なメチル化カテキンである EGCG3″,5″diMe と EGCG3′,3″,5″triMe の生成を確認した。EGCG3′,3″,5″triMe はその構造に関する報告はなく、新規物質であった。

CsOMT を用いることで、酵素変換法によりメチル化カテキンを製造できる可能性を第２章で示した。しかし、食品素材への展開を考えた場合、大腸菌で発現させた酵素を用いることは、非現実的である。一方、CsOMT は CCoAOMT と非常に高い相同性を示すことが判明した。この情報を手掛かりに食品への展開が可能であり、工業生産が可能な新たな酵素を探索することを第３章で検討した。CCoAOMT は担子菌ではリグニンの分解に関与していることから、キノコにも CsOMT と同様の活性を持つ酵素の存在が考えられた。キノコは食経験があり、その菌糸体は大量培養が可能であることから、有望な素材である。数種類の食用キノコの菌糸体を培養し、粗酵素を抽出して EGCG 反応させ、メチル化カテキンの生成の有無を指標にスクリーニングを行った。その結果、*Flammulina velutipes* (エノキタケ) から抽出した粗酵素を用いた場合に、EGCG3″Me、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe の生成を確認できた。さらに硫酸アンモニウム精製及

び各種カラムを用いて活性画分の精製を試みた結果、酵素の精製に成功した。精製した酵素の内部アミノ酸配列の一部を解読し、相同性検索を行ったところ、*O*-メチルトランスフェラーゼであることが判明した。内部アミノ酸配列情報をもとに、Fv-OMT の遺伝子単離を試みた。その結果、全長 690 塩基、推定アミノ酸 230 残基からなる遺伝子を単離することに成功した。ホモロジー検索を行ったところ、他の担子菌の *O*-メチルトランスフェラーゼと相同性を示した。そのため、本酵素は *F. velutipes* から単離した初めての *O*-メチルトランスフェラーゼであり、Fv-OMT (*Flammulina velutipes O*-methyltransferase) とした。Fv-OMT を大腸菌を用いて発現させ、EGCG と反応させたところ、EGCG3″Me、EGCG4″Me 及び EGCG3″,5″diMe 以外に新たに EGCG3″,4″diMe と EGCG4′,3″,5″triMe が生成されることを明らかにした。また、大腸菌を用いて発現させた Fv-OMT 組換え酵素を用いて至適 pH と温度を明らかにするとともに、Fv-OMT のメチル化カテキン生成の経時的変化を評価し、EGCG の水酸基に対する認識順位を示した。また、20 種類の様々なポリフェノールと反応させて生成されたメチル化体の有無を評価することで、Fv-OMT はピロガロール又はピロカテコール構造を認識するという基質特異性を明らかにした。一方、レゾルシノール、フロログルシノールやフェノールは認識しなかった。

第４章では予備検討ではあるが、メチル化カテキンの工業化を見据え、スケールアップ培養の検討を行った。三角フラスコスケールでエノキタケ菌糸体培養に適切な培地組成の情報を把握した。次いで 5 L ジャーファーメンターを用いて培養のスケールアップを図った。その結果、菌糸体をペレット状で増殖させつつ、ペレットから伸びてきた先端を剪断し、剪断された菌糸体から新たなペレットを形成させることが重要であることが解った。この培養法により、良好な菌糸体の増殖と酵素活性に繋がることを明らかにした。この得られた知見をもとに、さらに 90 L 培養タンクを用いた培養のスケールアップを行い、評価した。その結果、5 L ジャーファーメンターと同等の酵素活性得ることができた。90 L 培養タンクで菌糸体培養が成功したことは、今後の工業

スケールでの培養が可能であるとともに、酵素の安定生産が出来ることを示した。また、菌糸体培養物から抽出した粗酵素を用いて至適 pH と温度を明らかにした。同様に菌糸体培養物から粗酵素を抽出し、メチル化カテキン生成物の経時的変化を確認し、酵素の基質の水酸基の認識順位や反応順位を推察した。

第５章では、茶の酵素 CsOMT を用いて精製された新規メチル化カテキンの活性評価を行った。始めに ddY/slc マウスを用いて EGCG3″,5″diMe の毒性を確認した。100 mg/kg の単回強制経口投与を行い、14 日間にわたり体重、行動及び外観を観察したところ、異常は認められなかった。また 14 日後に各種臓器の秤量を行こない、対照群と比較して差は認められなかったことから、100 mg/kg 投与の試験条件下では、毒性は認められなかった。

マウスマスト細胞を用いたヒスタミン遊離抑制効果を評価したところ、EGCG3′,3″,5″triMe = EGCG3″,5″diMe > EGCG3″Me > EGCG の順であり、メチル基の数が増えるにつれて、抑制効果が強くなった。また、B 環の 3 位の水酸基のメチル化は、それほど抑制効果に寄与しないことが示唆された。これらの結果から、EGCG へのメチル基の修飾部位及びその数の違いによる活性の違いを明らかにした。メチル化カテキンは良好な血漿中濃度を示すことから、その指標の一つである化合物の脂溶性を評価するオクタノール/水分分配係数を測定し、メチル基の修飾によってどの程度増すかを比較した。その結果、メチル基の数か増えるにつれて脂溶性は増加し、血漿中への良好な移行性が期待できた。ポリフェノールは抗酸化活性を示し、その活性による抗アレルギー活性が報告されている。そのため、メチル化カテキンの DPPH ラジカル消去能活性を測定し、抗酸化活性を評価した。IC_{50} 値を算出したところ、EGCG>ECG>EGCG3″Me>EGCG3″,5″diMe> EGCG4″Me>EGCG3′,3″,5″triMe であった。この結果は、水酸基が減少がするにつれて DPPH ラジカル消去能、つまり抗酸化活性が弱わまる傾向にあった。また、EGCG の主な活性である抗菌活性を評価したところ、EGCG が最も高い活性を示し、メチル基の数が増すにつれて活性は低下する結果であ

った。

以上のことから、エノキタケの菌糸体培養物を用い、EGCG を基質としてと反応させることで、メチル化カテキンである EGCG3″Me と EGCG4″Me を生産することが可能となった。さらに新規メチル化カテキンの抗アレルギー活性を評価した結果、より強い効果を示したことから、将来はさらに優位性のある素材としての展開が期待できる。これにより、より強い抗アレルギー効果を示す食品素材を提供でき、将来は飲料、ゼリー、菓子、水産・畜産加工品、乳製品等の様々な形態の食品に展開可能となり、さらには栄養補助食品、機能性表示食品、または特定保健用食品への展開が可能と可能となった。また、アレルギー患者に対して副作用が無く、日常的に摂取できることで、生活環境の改善に貢献できることが期待できる

引用文献

[1] 申 堀口，洋 斎藤．栃木県日光地方におけるスギ花粉症 Japanese cedar pollinosis の発見，アレルギー 13 (1964) 16-18, 74-75.

[2] T. Yamada, H. Saito, S. Fujieda. Present state of Japanese cedar pollinosis: The national affliction, *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014) 632-9.e5.

[3] 村松敬一郎、小國伊太郎、伊勢村護、杉松公男、山本（前田）万里，茶の機能，株式会社学会出版センター (2002).

[4] Z. Y. Wang, J. Hong, M. Huang, K.R. Reuhl, A.H. Conney, C.S. Yang. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1- (3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea, *Cancer Res.* 52 (1992) 1943-1947.

[5] Z.Y. Wang, S.J. Cheng, Z.C. Zhou, M. Athar, W.A. Khan, D.R. Bickers, H. Mukhtar. Antimutagenic activity of green tea polyphenols, *Mutat. Res.* 223 (1989) 273-285.

[6] K. Fukai, T. Ishigami, Y. Hara. Antibacterial activity of tea polyphenols against phytopathogenic bacteria, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 1895-1897.

[7] M. Nakayama, K. Suzuki, M. Toda, S. Okubo, Y. Hara, T. Shimamura. Inhibition of the infectivity of influenza virus by tea polyphenols, *Antiviral Res.* 21 (1993) 289-299.

[8] W. Bors, M. Saran. Radical scavenging by flavonoid antioxidants, *Free. Radic. Res. Commun.* 2 (1987) 289-294.

[9] M. Hattori, I.T. Kusumoto, T. Namba, T. Ishigami, Y. Hara. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from streptococcus mutans, *Chem. Pharm. Bull.* 38 (1990) 717-720.

[10] H. Kakegawa, H. Matsumoto, K. Endo. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesentery mast cells, *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 5079-5082.

[11] M. Sano, M. Suzuki, T. Miyase, K. Yoshino, M. Maeda-Yamamoto. Novel antiallergic catechin derivatives isolated from oolong tea, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1906-1910.

[12] 山本（前田）万里、佐野満昭、松田奈帆美、宮瀬敏男、川本恵子、鈴木直子、吉村晶恭、立花宏文、袴田勝弘．茶の品種、摘採期と製造法によるエピガロカテキン3-*O*-(3-*O*-メチル)ガレート含量の変動，日本食品化学工学会誌 Vo.48, No.1 (2001) 64-68.

[13] N. Matsuo, K. Yamada, K. Shoji, M. Mori, M. Sugano. Effect of tea polyphenols on histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: The structure-inhibitory activity relationship, *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 52 (1997) 58-64.

[14] Y. Ohmori, M. Ito, M. Kishi, H. Mizutani, T. Katada, H. Konishi. Antiallergic constituents from oolong tea stem, *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995) 683-686.

[15] M. Maeda-Yamamoto, H. Kawahara, N. Matsuda, K. Nesumi, M. Sano, K. Tsuji, Y. Kawakami, T. Kawakami. Effects of tea infusions of various varieties or different manufacturing types on inhibition of mouse mast cell activation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 (1998) 2277-2279.

[16] M. Maeda-Yamamoto, H. Nagai, K. Asaii, S. Moriwaki, H. Horie, K. Kohata, H. Tachibana, T. Miyase, M. Sano. Changing in epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl) gallate and strictinin contents of tea (*Camella sinensis* L.) cultivar 'benifuki' in various degrees of maturity and leaf order, *Food Sci. Technol. Res.* 10(2) (2004) 186-190.

[17] M. Maeda-Yamamoto, N. Inagaki, J. Kitaura, T. Chikumoto, H. Kawahara, Y. Kawakami, M. Sano, T. Miyase, H. Tachibana, H. Nagai, T. Kawakami. *O*-methylated Catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 4486-4492.

[18] M. Suzuki, K. Yoshino, M. Maeda-Yamamoto, T. Miyase, M. Sano. Inhibitory effects of tea catechins and *O*-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate on mouse type IV allergy, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 5649-5653.

[19] Y. Fujimura, H. Tachibana, M. Maeda-Yamamoto, T. Miyase, M. Sano, K. Yamada. Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-methyl)- gallate, suppresses FcεRl expression in human basophilic KU812 cells, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5729-5734.

[20] H. Tachibana, Y. Sunada, T. Miyase, M. Sano, M. Maeda-Yamamoto, K. Yamada. Identification of a methylated tea catechin as an inhibitor of degranulation in human basophilic KU812 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 (2000) 452-454.

[21] M. Maeda-Yamamoto, H. Nagai, Y. Suzuki, K. Ema, E. Kanda, H. Mitsuda. Changes in *O*-methylated catechin and chemical component contents of 'benifuuki' green tea (*Camellia sinensis* L.) beverage under various extraction conditions, *Food Sci. Technol. Res.* 11 (2005) 248-253.

[22] M. Sano, T. Miyase, H. Tachibana, M. Maeda-Yamamoto. Antiallergic properties of tea components, *Fragrance J.* (2000) 46-52.

[23] Y. Oritani, Y. Setoguchi, R. Ito, H. Maruki-Uchida, T. Ichiyanagi, T. Ito. Comparison of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) and *O*-methyl EGCG bioavailability in rats, *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 1577-1582.

[24] M. Maeda-Yamamoto, K. Ema, T. Shibuichi. In vitro and in vivo anti-allergic effect of `benifuuki` green tea containing *O*-methylated catechin and ginger extract enhancement, *Cytotechnol.* 55 (2007) 135-142.

[25] G. Schrö der, E. Wehinger, J. Schrö der. Predicting the substrates of cloned plant *O*-methyltransferases, *Phytochem.* 59 (2002) 1-8.

[26] G. Schrö der, E. Wehinger, R. Lukač in, F. Wellmann, W. Seefelder, W. Schwab, J. Schrö der. Flavonoid methylation: A novel 4′-*O*-methyltransferase from catharanthus roseus, and evidence that partially methylated flavanones are substrates of four different flavonoid dioxygenases, *Phytochem.* 65 (2004) 1085-1094.

[27] M. Kato, K. Mizuno, A. Crozier, T. Fujimura, H. Ashihara. Caffeine synthase gene from tea

leaves, *Nature* 406 (2000) 956-957.

[28] L. Zhu, C.J. Jiang, W.W. Deng, X. Gao, R.J. Wang, X.C. Wan. Cloning and expression of selenocysteine methyltransferase cDNA from *Camellia sinensis*, *Acta Physiol. Plant.* 30 (2008) 167-174.

[29] G. Busam, K.T. Junghanns, R.E. Kneusel, H. Kassemeyer, U. Matern. Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-*O*-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L., *Plant Physiol.* 115 (1997) 1039-1048.

[30] D. Schmitt, A.F. Pakusch, U. Matern. Molecular cloning, induction, and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 17416-17423.

[31] F. Martz, S. Maury, G. Pinç on, M. Legrand. cDNA cloning, substrate specificity and expression study of tobacco caffeoyl-CoA 3-*O*-methyltransferase, a lignin biosynthetic enzyme, *Plant. Mol. Biol.* 36 (1998) 427-437.

[32]C.P. Joshi, V.L. Chiang. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases, *Plant. Mol. Biol.* 37 (1998) 663-674.

[33] J.P. De Mello, F. Petereit, A. Nahrstedt. Flavan-3-ols and prodelphinidins from stryphnodendron adstringens, *Phytochem.* 41 (1996) 807-813.

[34] 新名淳彦、吉田和哉監修．植物代謝工学ハンドブック，エヌ・ティー・エス発行 (2002) .

[35] R. Zhong, W. Herbert Morrison III, J. Negrel, Z.H. Ye. Dual methylation pathways in lignin biosynthesis, *Plant Cell* 10 (1998) 2033-2045.

[36] L. Diana, K. Meyer, G. Chapple, C.J. Douglas. Antisense suppression of 4-coumarate: Coenzyme A ligase activity in arabidopsis leads to altered lignin subunit composition, *Plant Cell* 9 (1997) 1985-1998.

[37] H. Lu, X. Meng, C.S. Yang. Enzymology of methylation of tea catechins and inhibition of

catechol-*O*-methyltransferase by (-)-epigallocatechin gallate, *Drug Metab. Dispos.* 31 (2003) 572-579.

[38] Y. Zhang, H.P. Lv, C.Y. Ma, L. Guo, J.F. Tan, Q.H. Peng, Z. Lin. Cloning of a caffeoyl-coenzyme A *O*-methyltransferase from *Camellia sinensis* and analysis of its catalytic activity, *J. Zhejiang Univ. Sci.* B. 16 (2015) 103-112.

[39] K. Okushio, M. Suzuki, N. Matsumoto, F. Nanjo, Y. Hara. Methylation of tea catechins by rat liver homogenates, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 430-432.

[40] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, C. Rémésy. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 230S-242S.

[41] G. Williamson, C. Manach. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. review of 93 intervention studies, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 243S-255S.

[42] K. Valli, M.H. Gold. Degradation of 2,4-dichlorophenol by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.* 173 (1991) 345-352.

[43] K. Valli, H. Wariishi, M.H. Gold. Degradation of 2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriol.* 174 (1992) 2131-2137.

[44] C. Coulter, J.T. Kennedy, W.C. McRoberts, D.B. Harper. Purification and properties of an S-adenosylmethionine: 2,4-disubstituted phenol *O*-methyltransferase from *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 706-711.

[45] M.R. Jeffers, W.C. McRoberts, D.B. Harper. Identification of a phenolic 3-*O*-methyltransferase in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiol.* 143 (1997) 1975-1981.

[46] C. Coulter, J.T.G. Hamilton, D.B. Harper. Evidence for the existence of independent chloromethane- and S- adenosylmethionine-utilizing systems for methylation in

Phanerochaete chrysosporium, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 1461-1466.

[47] J.L. Ferrer, C. Zubieta, R.A. Dixon, J.P. Noel. Crystal structures of alfalfa caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase, *Plant Physiol.* 137 (2005) 1009-1017.

[48] Y. Tanaka, M. Kirita, S. Miyata, Y. Abe, M. Tagashira, T. Kanda, M. Maeda-Yamamoto. *O*-methylated theaflavins suppress the intracellular accumulation of triglycerides from terminally differentiated human visceral adipocytes, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 12634-12639.

[49] Y. Tanaka, M. Kirita, Y. Abe, S. Miyata, M. Tagashira, T. Kanda, M. Maeda-Yamamoto. Metabolic stability and inhibitory effect of *O*-methylated theaflavins on H_2O_2-induced oxidative damage in human HepG2 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 1140-1146.

[50] L. Gangehei, M. Ali, W. Zhang, Z. Chen, K. Wakame, M. Haidari. Oligonol a low molecular weight polyphenol of lychee fruit extract inhibits proliferation of influenza virus by blocking reactive oxygen species-dependent ERK phosphorylation, *Phytomedicine* 17 (2010) 1047-1056.

[51] H. Tachibana, K. Koga, Y. Fujimura, K. Yamada. A receptor for green tea polyphenol EGCG, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (2004) 380-381.

[52] S. Yano, Y. Fujimura, D. Umeda, T. Miyase, K. Yamada, H. Tachibana. Relationship between the biological activities of methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) and their cell surface binding activities, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 7144-7148.

[53] U. Blank, C. Ra, L. Miller, K. White, H. Metzger, J.P. Kinet. Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor, *Nature* 337 (1989) 187-189.

[54] U. Blank, C. Ra, J.P. Kinet. Characterization of truncated α chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 2639-2646.

[55] Y. Fujimura, D. Umeda, Y. Kiyohara, Y. Sunada, K. Yamada, H. Tachibana. The

involvement of the 67 kDa laminin receptor-mediated modulation of cytoskeleton in the degranulation inhibition induced by epigallocatechin-3-*O*-gallate, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348 (2006) 524-531.

[56] D. Umeda, H. Tachibana, K. Yamada. Tea catechin, epigallocatechin-3-gallate suppresses myosin II regulatory light chain phosphorylation, *Biofactors* 21 (2004) 387-389.

[57] D. Umeda, S. Yano, K. Yamada, H. Tachibana. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 3050-3058.

[58] Y. Son, Y.K. Cheong, N.H. Kim, H.T. Chung, D.G. Kang, H.O. Pae. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways? *J. Signal Transduct.* 2011 (2011) Article ID792639.

[59] M. Kumazoe, K. Sugihara, S. Tsukamoto, Y. Huang, Y. Tsurudome, T. Suzuki, Y. Suemasu, N. Ueda, S. Yamashita, Y. Kim, K. Yamada, H. Tachibana. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 787-799.

[60] A.L. Gray, C.A. Stephens, R.L. Bigelow, D.T. Coleman, J.A. Cardelli. The polyphenols (-)-epigallocatechin-3-gallate and luteolin synergistically inhibit TGF-beta-induced myofibroblast phenotypes through RhoA and ERK inhibition, *PLoS One* 9 (2014) e109208.

[61] Y. Fujimura, D. Umeda, S. Yano, M. Maeda-Yamamoto, K. Yamada, H. Tachibana. The 67 kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of *O*-methylated EGCG, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364 (2007) 79-85.

[62] J. Rivera. Molecular adapters in FcεRI signaling and the allergic response, *Curr. Opin. Immunol.* 14(6) (2002) 688-693.

[63] Y. Baba, K. Nishida, Y. Fujii, T. Hirano, M. Hikida, T. Kurosaki. Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 81-88.

[64] X. Wen, T. Walle. Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability, *Drug Metab. Dispos.* 34 (2006) 1786-1792.

[65] U.K. Walle, T. Walle. Bioavailable flavonoids: Cytochrome P450-mediated metabolism of methoxyflavones, *Drug Metab. Dispos.* 35 (2007) 1985-1989.

[66] F. Nanjo, K. Goto, R. Seto, M. Suzuki, M. Sakai, Y. Hara. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, *Free Radic. Bio. Med.* 21 (1996) 895-902.

[67] Y. Hara, T. Ishigami. Antibacterial activities of tea polyphenols against foodborne pathogenic bacteria, *Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 36 (1989) 996-999.

[68] L. Sánchez-del-Campo, F. Otón, A. Tárraga, J. Cabezas-Herrera, S. Chazarra, J.N. Rodríguez-López. Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 2018-2026.

謝辞

本研究は、アサヒグループホールディングス株式会社、アサヒビール株式会社及び独立行政法人野菜茶業研究所金谷茶業研究拠点にて行われたものです。まず本研究を遂行するにあたり、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所の山本 (前田) 万里博士 (元独立行政法人野菜茶業研究所所属) には、茶やメチル化カテキンに関する本論文全般にわたってご指導を頂きました。また、実験に対するご指導や細胞評価を行っていただきました。深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、格別のご配慮を頂きましたアサヒグループホールディングス株式会社泉谷直木代表取締役社長兼 CEO、小路明善代表取締役社長兼 COO、アサヒビール株式会社平野真一代表取締役社長に深く感謝いたします。

また研究を共にして頂いた、横田豊一博士、佐見学博士、田頭素行博士、田中義久博士、本間大樹氏に深く感謝いたします。株式会社エルビーの武藤正氏にはタンパク質の精製方法に関して多大なるご指導を頂きました。理化学研究所内山元素化学研究室の内山真伸博士、村中厚哉博士、臼井信也博士 (実験当時)にはポリフェノールの構造に関する助言やカフェオイル‐CoA 化合物の合成に多大なるご協力を頂きました。独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構果樹研究所の庄司俊彦博士には LC-TOF-MS の測定を共に行って頂きました。

本研究の遂行にあたり、ポリフェノールに関する多大なる助言や研究の方向性に関してのアドバイス、投稿論文の構成に関してのご助言、そして学位取得の機会を頂きましたアサヒグループホールディングス株式会社の神田智正博士に深く感謝いたします。

筑波大学大学院の礒田博子教授には博士後期課程において学位を取得する機会を頂き、さらには学位論文の構成等で多大なるご指導を頂きました。心から感謝いたします。また、筑波大学大学院の張振亜教授、山路恵子准教授には論文審査を行って頂き、

適切な助言を頂きました。心から感謝いたします。

最後になりましたが、私を応援して下さいました両親、生活面や精神的な心の支えになって下さいました妻、子供達に心から感謝いたします。