

機関番号：21401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20510201
 研究課題名（和文） カンキツ類花器におけるカフェイン合成能と虫媒の関心の分子生物学的解釈
 研究課題名（英文） Molecular biological analysis of relationship between caffeine synthetic ability and entomophily in *Citrus* species.
 研究代表者
 水野 幸一（MIZUNO KOUICHI）
 秋田県立大学・生物資源科学部・准教授
 研究者番号：30302376

研究成果の概要（和文）：

カンキツ類では花器のみにカフェインが存在し、虫媒との関係が議論されている。本研究ではカフェインシンターゼ候補遺伝子の網羅的な単離と機能解析を行った。EST データベースに対してコーヒー、チャのカフェインシンターゼと相同性検索を行い、6つの候補遺伝子を得た。これらについて詳しく調べたところ、カフェインの合成に関与が疑われる酵素遺伝子一種と、それぞれジャスモン酸およびサリチル酸をメチル化する酵素遺伝子二種を見いだした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I conducted of the isolation and characterization of candidate genes for caffeine synthase in *Citrus* species. When I performed *in silico* screening against *Citrus* EST database, six candidate genes for caffeine synthase were obtained. Subsequently those genes were investigated fully, a suspected gene in relation to caffeine biosynthesis was found. Furthermore, I identified and characterized of the two genes respectively encoding the enzymes for the methylation of salicylate and jasmonate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,660,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：ケミカルバイオロジー、カフェイン、カンキツ類、メチルトランスフェラーゼ

1. 研究開始当初の背景

カフェインは有名な二次代謝産物であるが、含有する植物種は13目80種に限られている。またこれらの植物はお互いに系統分類的に近縁であるというわけではなく、多岐にわたる植物種がこのような特殊な二次代謝産物を共有することから、その合成経路は平行進化的に形成されてきたと申請者は考えている。これまでの研究で申請者らのグルー

プは、チャのカフェイン合成のキー酵素であるカフェインシンターゼ遺伝子の単離に世界で初めて成功し、さらに、プリンアルカロイドを蓄積するコーヒーなど他の植物からも相同遺伝子の単離に成功している。このように植物のカフェイン生合成に関する研究では世界をリードする立場にある。一方、ポリフェノール類の一種として広く知られているクロロゲン酸などと結合した形で液胞

に蓄積しているとの報告がある。これより申請者は、これらの合成もカフェインの合成と同調して進んでいると考え、カフェインと同時期に合成されるポリフェノール類の生合成に関与する酵素遺伝子の単離をめざし、これに対して平成 15-16 年度科学研究費補助金・若手研究Bを得て研究を行なっている。

これらの研究を通して、カフェインの合成経路それ自体についてはかなり分かってきたものの、いまだ解明されていない根本的な問題が残されている。それは、これらの植物だけがなぜカフェインを含み、それがどのような役割を担っているのかということである。植物体内におけるカフェインの役割について、これまで様々な考察がなされている。例えば葉や果実がカフェインを含むことによって虫害から身を守っている、あるいはそれらが落葉・落果することによって他の植物の繁茂を防ぐアレロパシー効果があると言われる。しかし実際には考察の範囲を超えておらず、実質的な検証が充分になされていないのが現状である。そのような中でカンキツ類の花器特異的にカフェインが含まれていることが報告されているが、この中で授粉を手助けするミツバチと、花器に含まれるカフェインの関係について興味深い考察がされている。花器の中で蜜腺にもカフェインが含まれていることが分かり、これがミツバチの行動に何か影響を与えているのではないかと考察している。しかし、ここでも考察の域を脱しておらず、さらにカフェインがあるという事実だけで実際にその合成が花芽形成のどの段階から始まりピークを迎えるのか、あるいは授粉の時期と同調性が見られるのかと言ったことはまったく分かっていない。そこで本研究では、カンキツ類花器におけるカフェイン合成と虫媒の関係について、はたして共生関係はあるのか分子生物学的手法を用いて解明をめざす。

2. 研究の目的

カフェインが化合物としては花器特異的に存在することが報告されているが、遺伝子の発現レベルではどのようになっているのか、まず確認する必要があると考えている。特に、我々が食用にしている果実ではどのようになっているのか興味を持たれる。そこでカフェイン合成と虫媒の関係を調べる前段階として、カンキツ類よりカフェイン合成に関与する遺伝子群の単離を試み、それらの花器形成における発現調節機構について調べる。なおここで言う発現調節機構とは、カフェイン合成系酵素遺伝子を中心として蜜腺に含まれる主な物質、特に昆虫を誘引する物質の合成に関わる酵素遺伝子との発現に同調性があるのかと言うことも含んでいる。花器におけるカフェイン合成系酵素遺伝子の

発現が確認され次第、それらについても調べて行きたいと考えている。研究の具体的な進め方としては、

- (1) カフェイン合成系酵素遺伝子の単離
- (2) 組織・時期特異的発現の確認
- (3) 組換え型酵素の生産と機能解析（実際にカフェイン合成能を有するかを確認する）
- (4) 蜜腺に含まれる昆虫を誘引する物質の合成に関わる酵素遺伝子群の単離（カフェインとともに蓄積しているポリフェノール類の合成に関わる酵素遺伝子や蜜の合成つまり糖代謝に関わる酵素遺伝子）
- (5) (4) で単離した遺伝子群のカフェイン合成系酵素遺伝子の発現パターンとの比較

3. 研究の方法

以下の項目・段階に分けて研究を進めた。

- (1) カフェイン合成系酵素遺伝子の単離
コーヒーやチャのカフェインシンターゼ (CCS1 および TCS1)、テオブロミンシンターゼ (CTS1)、7-メチルキサントシンシンターゼ (CmXRS1)、およびその立体構造まで明らかにされている *Clarkia breweri* のサリチル酸メチルトランスフェラーゼ (SAMT) などの B' モチーフ型メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs) に属する酵素の cDNA 塩基配列をもとに、保存されている領域からディジェネレートプライマーを作製し、カンキツ類（入手のしやすさからウンシュウミカン、またはスダチを想定）の開花直前のつぼみ由来全 RNA を鋳型として RT-PCR および RACE 法を用いてカフェインシンターゼ類候補遺伝子を得る。現在、予備実験としてスダチつぼみ由来全 RNA を鋳型とした RT-PCR を行ない、CCS1 と相同性の見られる cDNA 断片を得ている。cDNA 全長の単離に際しては RACE 法を適用する予定であるが、今後の (4) の実験である、蜜腺に含まれる物質の合成に関わる遺伝子群の単離も考慮して、つぼみ由来 cDNA ライブラリーの調製も行なう。

- (2) 組織・時期特異的発現の確認および、
 - (3) 組換え型酵素の生産と機能解析（実際にカフェイン合成能を有するかを確認する）
- これら2項目は並行して行なう。

(2) の実験のためには組織ごとと、花器成熟過程および果実成熟過程を追っての試料調製が必要である。花器成熟および果実成熟は特に期間が限定されているため必要な試料が十分量得られるようにすることが最重要である。試料が得られれば (1) で単離した各遺伝子についてノーザンブロット分析や定量的 RT-PCR にて発現部位・時期を特定する。(2) の実験は試料調達に時間を要することが想定されるため、平行して (3) の実験を行なう。(1) の実験では SAMT 相同遺伝子等のカフェイン合成以外であるが類

似のメチル化酵素の遺伝子が得られる可能性があるため、機能の確認が不可欠である。ここでは、CCS1 などコーヒーやチャ由来の遺伝子において組換え型酵素の生産と機能解析で実績のある、大腸菌を用いた組換えタンパク質発現系である pET-system を用いて候補遺伝子群由来の組換え型酵素を生産し、機能の確認を行なう。

(4) 蜜腺に含まれる昆虫を誘引する物質の合成に関わる酵素遺伝子群の単離 (カフェインとともに蓄積しているポリフェノール類の合成に関わる酵素遺伝子や蜜の合成つまり糖代謝に関わる酵素遺伝子)

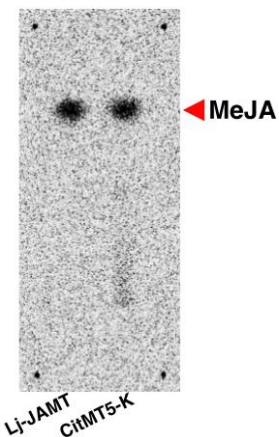
蜜腺に含まれる糖類やポリフェノール類など、主な物質の合成に関わる酵素遺伝子を単離する。これは発現パターンがカフェインシンターゼ類酵素の遺伝子と同調しているかどうかを調べるためのものであることから、既知遺伝子であれば cDNA の全長を単離する必要はないと考えている。しかし、「主な物質」の合成に関わる遺伝子と言っても、カンキツ類からはじめて単離されるものであれば、その断片を得ることさえ難しいかもしれない。そこで、「主な物質」の特定が困難であり、未知の遺伝子で場合は (2) の実験によって明らかとなった、カフェインシンターゼ類酵素遺伝子の発現と同じパターンを示す遺伝子を網羅的に単離して、データベースの相同性検索によってその中から先にあげた物質の合成に関与が疑われる遺伝子を選択する。この場合、単離した遺伝子の機能を同定する必要があるため、(1) の実験で調製した cDNA ライブラリーを用い、cDNA の全長を得る。遺伝子の網羅的単離には cDNA-AFLP 法を利用する。

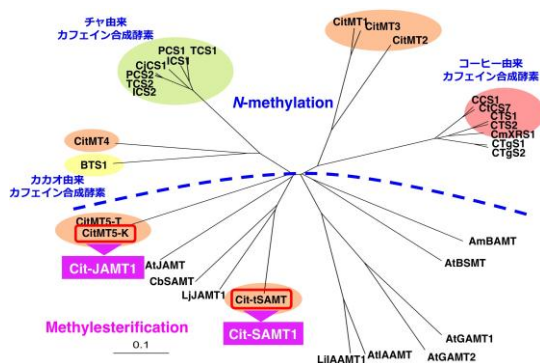
4. 研究成果

カフェイン合成を司る酵素遺伝子は、コーヒーやチャについて単離・機能解析が進められており、植物の生長制御に関わる化合物のメチル化を行なう酵素と類似の構造を有する一群 (モチーフ B'-メチルトランスフェラーゼファミリー (B'-MTs)) を形成していることが明らかとなっている。一方、カンキツ類について、カフェインが花器特異的に存在するとの報告があるものの、その酵素遺伝子は不明のままであった。そこで、カンキツ類のカフェイン合成においても B'-MTs に属する酵素が関与しているとの仮説のもと、スダチを材料にカフェインシンターゼ (CS) 遺伝子の単離と機能解析をめざした。B'-MTs 保存領域のディジェネレートプライマーとスダチのつぼみより調製した全 RNA を用いた RT-PCR と、オレンジ、ミカンなどのカンキツ類の EST データベースに対する *in silico* スクリーニングの結果、3 種類の CS 候補遺伝子 (CitMT1、CitMT2 および CitMT3 と命名) が見いだされた。

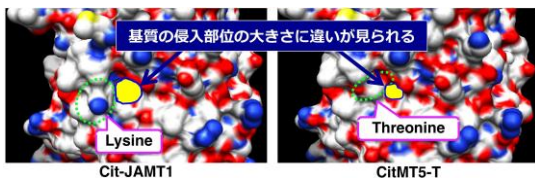
そこでまず、今後の研究計画も考慮してスダチつぼみ由来 cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーを鋳型として、また EST データベースおよび先の RT-PCR の結果からの配列情報をもとに作製したプライマーを用いて PCR を行い、CitMT1、CitMT2 および CitMT3 の全長の単離に成功した。それぞれ全長 1104、1053 および 1083 bp であり、368、351 および 361 アミノ酸からなる酵素タンパク質をコードしていた。これらは、コーヒーの CS である CCS1 とそれぞれ 42.4、39.7、41.9% の相同性を示した。これらについて大腸菌を用いた発現型を構築し、組換え型酵素の生産を試み、B'-MTs およびカフェインシンターゼに典型的な基質を用いて活性測定を行い、機能を調べた。その結果、このうち CitMT2 は N-メチル化活性を持たないことが判明した。3 遺伝子の単離以降、オレンジ、ミカンなどのカンキツ類の EST データベースがさらに充実したことから、これらに対する *in silico* スクリーニング再度行った。その結果、新たに 3 種類の CS 候補遺伝子 (CitMT4、CitMT5 および Cit-tSAMT と命名) を得た。全長はそれぞれ 1083、1098、および 1110 bp であり、362、366、および 370 アミノ酸残基をコードしていた。CCS1 とそれぞれ 39.1、37.7、38.3% の相同性を示した。これらのうち CitMT5 は、アミノ末端側から 5 番目のアミノ酸残基がリジンのタイプとスレオニンのタイプの 2 種類が得られた。これらについて大腸菌を用いた発現型を構築し先の 3 種類と同様に調べた。その結果、Cit-tSAMT は相同性から予想された通り、サリチル酸をメチル化しサリチル酸メチルを生成する、サリチル酸メチルトランスフェラーゼであることが判明した。一方

CitMT5 はリジンのタイプのみが、左図に示したように、TLC にてミヤコグサのジャスモン酸メチルトランスフェラーゼと同じ生成物のスポットを得たことから、ジャスモン酸をメチル化してジャスモン酸メチルを生成する、メチルエステル化活性を持つことが判明した。これらをそれぞれ Cit-SAMT1、および Cit-JAMT1 と命名した。至適 pH はそれぞれ、Cit-SAMT1 は緩衝液としてリン酸緩衝液を用いた場合に pH 7.5、Cit-JAMT1 は Tris/HCl を用いた場合に pH 8.5 であった。単離した CitMT シリーズと関連酵素の分子系統樹を作成したところ (次項図)、Cit-JAMT1、Cit-SAMT1 は他の植物か





ら単離されている JAMT, SAMT と近縁であり、これらの酵素は基質が同じであれば植物種を隔ても相同性が高いことが示された。Cit-JAMT1 はスレオニンのタイプと 1 アミノ酸残基の違いによって活性の有無が見られたことから、これらの酵素の立体構造予測を行ったところ、当該アミノ酸残基は基質結合部位の入口付近に位置し、トレオニンの場合基質が基質結合部位に入るのを妨げる構造を取るとの予測を得た（下図）。一方、本実



験で CitMT1 がカフェインシンターゼである可能性が示唆されたものの、確証は得られておらず、その後の研究の進捗に大きく影響したことは否めない。このように、EST データベースからの *in silico* スクリーニングではカフェイン合成に関わるものの単離に至らなかったこと、今後の蜜腺由来の昆虫誘因に関わる化合物の合成酵素遺伝子の単離のために、カフェインが含まれていることが確認されている、レモンのつばみ由来の cDNA ライブラリーを新たに調製し、それを用いたスクリーニングを開始した。その結果、これまでに解析した遺伝子とともに新規の B'-MTs 酵素遺伝子を見いだした。現在、大腸菌発現系を用いて、それらの機能解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

① Mizuno K., Kurosawa S., Yoshizawa Y. and Kato M. Essential region for 3-N methylation in N-methyltransferases involved in caffeine biosynthesis. *Z. Naturforsch.* 65c, pp257-267, 2010. 査読有

② Kato M., Kitao N., Ishida M., Morimoto H., Irino F. and Mizuno K. Expression Analysis of the Genes for Caffeine Biosynthesis and its Related Enzymes in *Camellia sinensis*. *Z.*

Naturforsch. 65c, pp245-256, 2010. 査読有

③ Hatakeyama T., Mizuno K. and Kurosawa S. Purification and properties of a nuclease from the fruit body of *Tricholoma matsutake*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, pp206-208, 2010. 査読有

④ Ishida, M., Kitao, N., Mizuno, K., Tanikawa, N. and Kato, M. Occurrence of theobromine synthase genes in purine alkaloid-free species of *Camellia* plants. *Planta* 229, pp559-568, 2009. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

① 北尾直子、柴田萌、水野幸一、谷川奈津、加藤美砂子 ツバキ科植物におけるモチーフ B'メチルトランスフェラーゼファミリーの多様性、日本植物生理学会大会、仙台、2011. 3. 20

② 松崎正博、常盤野哲生、加藤美砂子、吉澤結子、水野幸一 コーヒー由来カフェインシンターゼ相同新規 N-メチルトランスフェラーゼの機能解析、日本農芸化学会大会、東京、2010. 3. 28

③ 北尾直子、柴田萌、水野幸一、谷川奈津、加藤美砂子 ツバキ科植物におけるカフェインシンターゼ相同遺伝子の構造と機能、第 51 回日本植物生理学会大会、熊本、2010. 3. 18

④ 松崎正博、常盤野哲生、加藤美砂子、吉澤結子、水野幸一 コーヒー由来新規 N-メチルトランスフェラーゼの機能解析、日本農芸化学会東北支部第 144 回大会、盛岡市、2009. 10. 31 8

⑤ 松崎正博、常盤野哲生、加藤美砂子、吉澤結子、水野幸一 コーヒーのカフェインシンターゼ相同遺伝子の機能解析、日本植物学会第 73 回大会、山形市、2009. 9. 18

⑥ 北尾直子、柴田萌、水野幸一、谷川奈津、加藤美砂子 ツバキ科植物におけるカフェイン合成酵素遺伝子の多様性、日本植物学会第 73 回大会、山形市、2009. 9. 1

⑦ 齋藤健一、吉澤結子、水野幸一 コーヒー果実由来シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ (CaCAD1) の機能解析、日本農芸化学会福岡大会、2009. 3. 27-29

⑧ 齋藤健一、吉澤結子、水野幸一 コーヒー由来シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ酵素遺伝子の単離と機能解析、日本植物学会東北支部福島大会、2008. 12. 13-14

⑨ 齋藤健一、吉澤結子、水野幸一 コーヒー由来シナミルアルコールデヒドロゲナーゼ相同遺伝子の単離と解析、日本農芸化学会東北支部会弘前大会、2008. 10. 11

〔図書〕(計 1 件)

① 駒嶺穆総編集、藤村達人ほか編、水野幸一ほか著、朝倉書店「植物ゲノム科学辞典」、2008 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 幸一 (MIZUNO KOUICHI)

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：30302376