

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：12611
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22603004
 研究課題名（和文） カフェインの輸送と蓄積の分子機構の解明
 研究課題名（英文） Studies of the molecular mechanism in the transport and the accumulation of caffeine
 研究代表者
 加藤 美砂子 (KATO MISAKO)
 お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授
 研究者番号：60272738

研究成果の概要（和文）：

カフェインはツバキ科植物であるチャに特異的に蓄積されるプリンアルカロイドである。ツバキ科植物からカフェイン合成酵素の相同遺伝子として、20個のモチーフ B' メチルトランスフェラーゼ遺伝子を単離し、分子系統解析を行った。これらの遺伝子がコードする酵素タンパク質の立体構造を推定し、基質結合部位を比較した。さらに、チャの植物体からカフェインを蓄積する緑色カルスを誘導し、カフェインの輸送と蓄積を研究するためのモデル実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Caffeine is a purine alkaloid that is present in high concentration in *Camellia sinensis*. Twenty motif B' methyltransferase genes were isolated from plants Theaceae as the homologous gene to caffeine synthase. The overall structure of these methyltransferases and the spatial structure of the substrate binding sites were predicted by comparative modeling. Moreover, green callus containing caffeine was induced from the tea plant as the model experiment system to investigate the transport and the accumulation of caffeine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：カフェイン テオブロミン チャ ツバキ科植物 プリンアルカロイド

1. 研究開始当初の背景

チャ (*Camellia sinensis*) やコーヒー (*Coffea arabica*) などに含まれるカフェイン (1,3,7-

トリメチルキサンチン) はプリン環にメチル基がついた誘導体で、プリンアルカロイドと総称される二次代謝産物である。その他の植物アルカロイドであるニコチンやモルヒネ

などと比べると、カフェインは限られた分類群ではなく、広い範囲の植物に分布している。さらに、プリンアルカロイドを蓄積する植物はツバキ科のチャ、アカネ科のコーヒー、アオギリ科のカカオなど、系統分類学上ピンポイントで存在しているといえる。

カフェイン生合成はキサントシンの生成とそれに続くメチル化反応の過程から成る。チャやコーヒーにおけるキサントシンからの主要な合成経路は、キサントシン→7-メチルキサントシン→7-メチルキサンチン→テオブロミン (3,7-ジメチルキサンチン) →カフェインである。これらのメチル化反応のメチル基供与体はすべて SAM (*S*-アデノシル-L-メチオニン) である。キサンチン骨格の形成と3段階のメチル化反応を比較すると、メチル化反応がカフェイン生合成の律速段階と考えられる。プリン環の *N*-3 位と *N*-1 位のメチル化を触媒する *N*-メチルトランスフェラーゼはカフェインシンターゼと呼ばれている。カフェイン合成に関与する *N*-メチルトランスフェラーゼは、SAM 結合領域としてモチーフ A、モチーフ B'、モチーフ C と呼ばれる保存領域をもっており、低分子のメチル化に関与する植物特有のモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーに属している。このファミリーには、サリチル酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ (SAMT)、安息香酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ (BAMT)、ジャスモン酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ (JAMT)、インドール-3-酢酸メチルトランスフェラーゼ (IAMT) などが存在する。

カフェインを蓄積することで知られるチャは、ツバキ科ツバキ属に属する。しかし、ツバキ属のなかでも、プリンアルカロイドを蓄積する種は限られており、同じツバキ属のヤブツバキ (*Camellia japonica*) やサザン

カ (*Camellia sasanqua*) にカフェインやテオブロミンは含まれない。しかし、当研究グループではプリンアルカロイド合成能を持たないツバキ属植物にもテオブロミンシンターゼ遺伝子が普遍的に存在し、その転写産物が存在することが明らかにしている。

また、カフェインの生合成は若い葉でさかんに行われるが、葉が成長する過程でその合成能は急激に低下する。カフェインシンターゼ遺伝子の転写産物も葉の展開と共に減少するが、その調節を行う因子は明らかにまっていない。そのため、カフェイン代謝を総合的に考えていくためには、葉齢以外の因子によってカフェイン合成を制御できる有効なモデル実験系の開発が不可欠と思われる。

2. 研究の目的

(1) 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の解析
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遺伝子の構造と機能を解析し、ツバキ科植物におけるこれらの遺伝子の分子進化からカフェインの蓄積について考える。

(2) 培養細胞を用いたモデル実験系の開発
カフェインの輸送と蓄積を考えるための培養細胞を用いたモデル実験系を構築する。

3. 研究の方法

モチーフ B' メチルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

CTAB 法により RNA を抽出した後、TaKaRa 3' -Full RACE Core Set (TaKaRa) および TaKaRa 5' -Full RACE Core Set (TaKaRa) を用いて目的遺伝子を単離した。得られた断片を、常法に従って、pGEM-T Easy Vector (プロメガ) にサブクローニングした後に、塩基配列を決定した。

メチルトランスフェラーゼ活性の測定

pET32a ベクターに得られた cDNA 断片を挿入し、大腸菌 BL21 で組換え型酵素を作製した。HisTrap FF crude Kit (GE Healthcare) を用いて酵素を精製した後に、メチルトランスフェラーゼ活性は *S*- [methyl-¹⁴C] Adenosyl-L-methionine (2GBq/mmol, 室町薬品) からプリン環への放射活性の取り込みを測定することにより求めた。反応生成物は反応液からクロロホルム抽出し、シリカゲル薄層プレートを用いて、ブタノール/酢酸/水 (4:1:2, v/v) またはブタノール/酢酸/水 (4:1:1, v/v) を用いて展開した。展開後の TLC プレートは、Typhoon FLA7000 (GE ヘルスケア) で解析を行った。

立体構造の予測

総合計算化学システム MOE (菱化システム) を使用して、*Clarkia breweri* のサリチル酸メチルトランスフェラーゼ (1m6eX) を鋳型としてホモロジーモデリングを行った。

カルスの誘導

3%スクロース、0.1~4 μ M IBA、17.8 μ M ベンジルアデニン、0.6mM ミオイノシトール、26.6 μ M グリシン、4.0 μ M ニコチン酸、0.3 μ M 塩酸チアミン、2.4 μ M 塩酸ピリドキシンを添加した 0.7%アガロースを加えた MS 培地で、カルスを誘導した。増殖したカルスは、上記の組成のうちの IBA を 1 μ M とした培地で継代培養した。アデノシンを投与した培地は、上記の培地に 0.5mM のアデノシンを添加した。

HPLC によるプリンアルカロイドの分析

凍結乾燥または凍結保存した試料に 4 倍容の 100%エタノールを加え、プリンアルカロイドを抽出した。HPLC 分析は Prominence HPLC

システム (Shimadzu) を用いて行った。移動相はメタノール/酢酸/水 (20:5:75) を用い、Shim-pack VP-ODS カラム (Shimadzu) で流速 0.75ml/min で 10 分間 272nm の吸光度を測定した。

ディファレンシャルディスプレイ法による遺伝子の単離抽出した total RNA (3 μ g) を材料にして、Gene Fishing DEG Premix Kit (Funakoshi) を用いてジヤスモン酸によって誘導される遺伝子断片を得た。得られた断片を、常法に従って、pGEM-T Easy Vector (プロメガ) にサブクローニングした後に、塩基配列を決定した。

リアルタイム PCR による転写産物の定量

SYBR[®] Green を用いたインターカレーション法により Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行った。

bHLH 遺伝子の定量には、

5' -ACGATGGTAGAGAGCCATGC-3' と

5' -CCCAGAAACCATATTCAGGA-3' を、内在性コントロールのアクチン遺伝子は

5' -TCTTGATCTTGCTGGTCGTG-3' と

5' -GGGCCATCTGAATCTCTCAGC-3' をプライマーとして用いた。

4. 研究成果

(1) 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の解析

① 10 種のツバキ科植物からモチーフ B' メチルトランスフェラーゼ遺伝子の cDNA を計 20 個単離することに成功した。このうち ORF の全長を含む cDNA は 19 個である。単離した遺伝子をそれぞれ、*GaxMT1*、*GaxMT2*、*GaxMT3*、*GaxMT4* (タイワンツバキ)、*GacMT1*、*GacMT2*(partial)、*GacMT3*(partial) (オオバタイワンツバキ)、*SpMT1*、*SpMT2*(partial) (ナ

ツツバキ)、*SmMT1*、*SmMT2*(partial) (ヒメシヤラ)、*SCmMT1*、*SCmMT2*、*SCmMT3* (ムニンヒメツバキ)、*CLjMT1* (サカキ)、*EjMT1*、*EjMT2* (ヒサカキ)、*TgMT1* (モッコク)、*FaMT1* (フランクリンツバキ)、*TvMT1* (ヒサカキサザンカ) と命名した。*GaxMT1*、*GaxMT2*、*GacMT1*、*SpMT1*、*SmMT1*、*SCmMT1*、*SCmMT2*、*CLjMT1*、*EjMT1*、*EjMT2*、*TgMT1* は 364-368 のアミノ酸をコードし、タンパク質の分子量はいずれも約 41kDa と推定された。*GaxMT3*、*SCmMT3*、*FaMT1*、*TvMT1* は 351-359 のアミノ酸をコードし、タンパク質の分子量は約 40kDa と推定された。*GaxMT4* は 385 のアミノ酸をコードし、タンパク質の分子量は約 43kDa と推定された。等電点は、*GacMT1* 以外は 4.92-5.87 の範囲内であった。*GacMT1* の等電点は 10.1 であり、*TCS1* の等電点 9.85 に近い値であった。これらの遺伝子がコードするタンパク質の推定アミノ酸配列はいずれもモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの特徴である保存領域モチーフ A、モチーフ B'、モチーフ C、YFFF region を有していた。推定アミノ酸配列を用いて ClustaW で分子系統解析を行った結果を図 2 に示した。ツバキ科植物のモチーフ B' メチルトランスフェラーゼは 1 つのクレードに集約せず、分散して位置していた。

② 先に得られたモチーフ B' メチルトランスフェラーゼを大腸菌で発現させ、組換え型タンパク質の活性を測定した。その結果、オオバタイワソウツバキの *GacMT1* にテオブロミンシンターゼ活性を、ヒサカキの *EjMT1* からサリチル酸メチルトランスフェラーゼ活性を検出することができた。他の組換え型酵素は、調べた範囲の化合物を基質にはできなかった。

③ *Clarkia breweri* のサリチル酸メチルト

ランスフェラーゼ (1m6eX) を鋳型として、*TCS1* (チャ)、*CjCS1* (ヤブツバキ)、*GacMT1* のホモロジーモデリングを行った。最適化したモデリング構造において、site finder 機能を使って、基質結合部位の推定を行った。候補とされた活性部位において、ドッキングシミュレーションを行い、メチル基需容基質の 7-メチルキサンチンと SAM の結合状態を推定した。活性部位付近のタンパク質表面を描画し、空間構造の違いを比較した。

これらのシミュレーションから、*TCS1*、*CjCS1*、*GacMT1* がもつ 2 つの基質の結合ポケットは空間として 2 つに分かれて存在している可能性が示された。これはチャのプリンアルカロイド合成に関わるモチーフ B' メチルトランスフェラーゼの特徴であることが示唆された。特に、*TCS1* におけるメチル基受容基質の結合は、独立性が高く、比較的狭い空間に 7-メチルキサンチンが結合していた。以前の報告では、*PCS1* のヒスチジンを *TCS1* において対応するアルギニンに置換すると、カフェインシンターゼ活性をもつようになることが示されている。*TCS1* のアルギニンと *CjCS1* と *GacMT1* のヒスチジンをオレンジ色の太い棒で示した (図 2)。いずれの残基も活性部位近傍に見られ、基質結合に関与しているアミノ酸である可能性が示された。*TCS1*、*CjCS1* においては、7-メチルキサンチンへの直接的な結合が推定された。

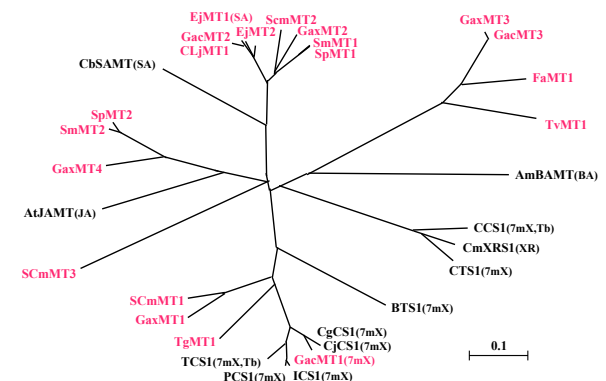


図 1 ツバキ科植物のモチーフ B' メチルト

ランスフェラーゼの分子系統樹. 本研究で単離した遺伝子を赤字で示す.

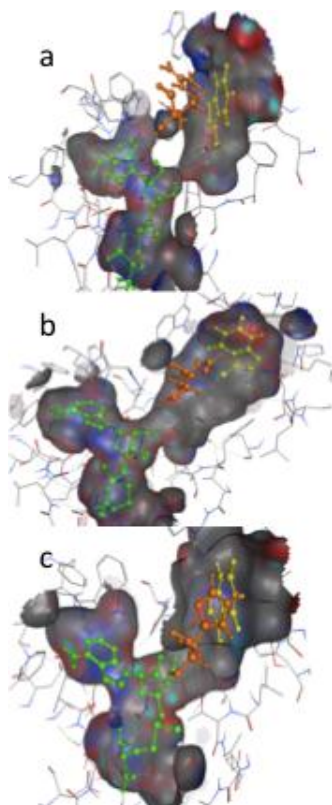


図2 基質結合空間の模式図. TCS1(a), CjCS1(b), GacMT1(c)を示す.

(2) 培養細胞を用いたモデル実験系の開発

① チャの茎からカフェインを蓄積する緑色カルスの誘導に成功した (図3)。培地にアデノシンを添加することにより、カフェインの蓄積量は増加した (図4)。植物ホルモンによるカフェイン合成への影響を調べるため、継代培養に用いるアデノシンを添加した培地に、IBA、JA、SA の各種植物ホルモンを投与し、カルスを植え継いでから2週目のカフェイン蓄積量を、HPLCを用いて測定した (図5)。カフェインの蓄積量は、植物ホルモンを投与していないコントロールに対し、0.1 μ M IBA では0.14倍、10 μ M IBA では1.7倍、1 μ M JA では0.75倍、200 μ M JA では0.59

倍、50 μ M SA では0.59倍、200 μ M SA では0.78倍に減少した。一方で、50 μ M JA では1.32倍に蓄積量が増加した。

以上の結果より、JAによるカフェイン合成を誘導するモデル実験系の構築に成功した。

② 先に構築したモデル実験系を用いて、カフェインの合成、輸送、蓄積等に関する因子を探索するために、ディファレンシャルディスプレイ法によって JA 投与によって特異的に発現する遺伝子を探索した。確認された発現差のある遺伝子断片は19本であり、そのうち14本の塩基配列を解析した。既知の遺伝子と相同性が認められた遺伝子でカフェイン代謝に関する可能性のあるものを探したところ、bHLH型転写因子と思われるcDNAを確認した。リアルタイムPCRを用いてこのbHLH型転写因子の転写産物の定量を行った。50 μ M JAの投与から1週間後のカルスでは発現量に差が見られなかった。しかし、2週間後のカルスにおいて、コントロールでは2.7倍に発現量が増加したのに対し、50 μ M JAでは6.7倍まで発現量が増加した (図6)。今後は検出したbHLH型転写因子の全長のcDNAを単離し、カフェイン代謝にどのように関与するのかを詳細に調べていく予定である。

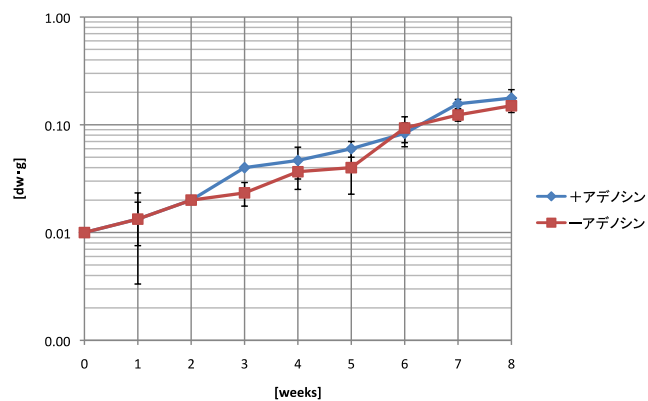


図3 緑色カルスの増殖曲線. 重量は乾燥重量で表示している。

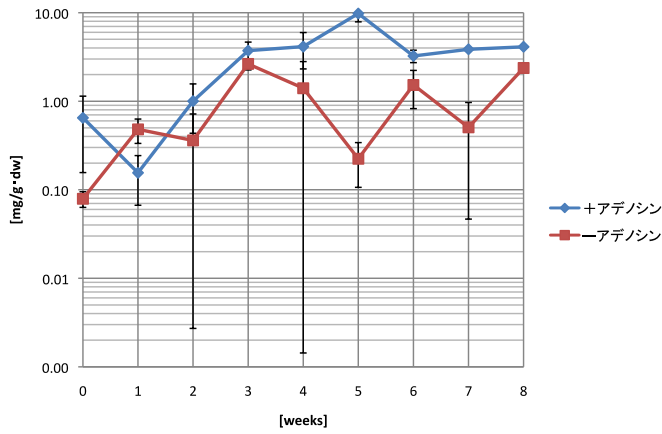


図4 HPLC で測定したカフェイン蓄積量の変化。乾燥重量当りの蓄積量で示す。

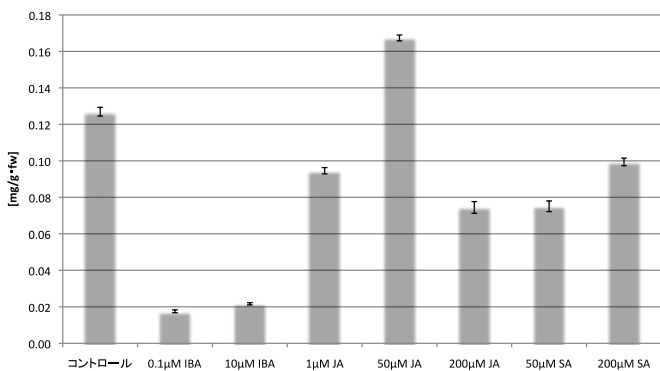


図5 各種植物ホルモンを投与した培地において、植え継ぎから2週間後のカフェイン蓄積量。生重量当りの値で示す。

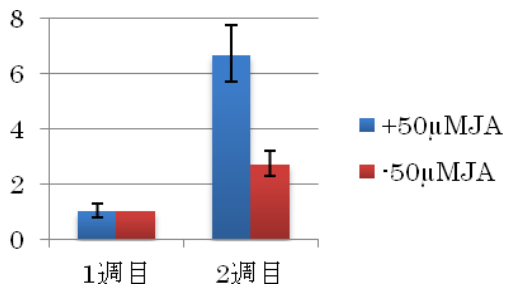


図6 リアルタイム PCR を用いた bHLH 様遺伝子の発現量の変化。

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)

[学会発表] (計4件)

①金澤志保、北尾直子、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の構造と機能 第54回日本植物生理学会年会 2013年3月23日、岡山大学

②金澤志保、北尾直子、水野幸一、谷川奈津、加藤美砂子 分子構造から考えるモチーフ B' メチルトランスフェラーゼの機能と進化 日本植物学会第76回大会、2012年9月16日、兵庫県立大学

③北尾直子、金澤志保、柴田萌、水野幸一、谷川奈津、加藤美砂子 ツバキ科植物からのモチーフ B' メチルトランスフェラーゼの単離と解析、日本植物学会第75回大会、2012年9月19日、東京大学

④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の多様性 第52回日本植物生理学会年会 2012年3月20日 東北大学 (東日本大震災のため要旨発表による開催)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤美砂子 (KATO MISAKO)

お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授

研究者番号：60272738

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし