

Short Report

カフェイン生合成系酵素群の分子進化

カフェイン生合成系酵素はモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーに属する

水野幸一¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科

カフェイン (1,3,7-トリメチルキサンチン) とテオブロミン (3,7-ジメチルキサンチン) は良く知られているプリンアルカロイドの一種で、コーヒー、チャ、コーラ、ガラナ、マテ、およびカカオなどに含まれる。カフェイン生合成経路はモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーに属する、基質特異的な N-メチルトランスフェラーゼ (N-メチル化酵素) 依存的である。プリンアルカロイド含有植物におけるカフェイン生合成経路はそれらの酵素遺伝子を持つ植物間で平行進化的に獲得されていたと考えられる。今回、それら酵素遺伝子がモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの中で、どのような位置づけになるのか考察した。

キーワード: カフェイン, メチルトランスフェラーゼ, コーヒー, 分子進化, 分子系統樹, トリゴネリン

序文

カフェイン (1,3,7-トリメチルキサンチン) とテオブロミン (3,7-ジメチルキサンチン) は良く知られているプリンアルカロイドの一種で、コーヒー、チャ、コーラ、ガラナ、マテ、およびカカオなど限られた植物に含まれる。カフェイン生合成経路で働く酵素は、モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーに属する、基質特異的な N-メチルトランスフェラーゼ (N-メチル化酵素) である。カフェインのようなプリンアルカロイド含有植物の持つカフェイン生合成経路は、それらの酵素遺伝子がそれぞれの植物種で平行進化的に獲得・発展してきたと考えられる。今回それら酵素遺伝子が、近縁にあたるカルボキシメチルトランスフェラーゼファミリーと、モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの中でどのような位置づけになるのか考察した。

方法

本研究室で単離した遺伝子の塩基配列の解析は秋田県立大学バイオテクノロジーセンターに依頼した。相同性検索等の遺伝子解析には、MacVector (CeresBioscience; www.ceresbio.co.jp) および GENETYX-Mac ((株) ゼネティックス, 東京) を用いた。分子系統樹は、近隣結合法 (NJ 法) に基づいて、ゲノムネット (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) の ClustalW 用いて作成した。それぞれの配列データは以下のものを用いた。アラビカコーヒー *Coffea arabica* CmXRS1(AB034699), アラビカコーヒー *C. arabica* CTS1(AB034700), アラビカコーヒー *C. arabica* CCS1(AB086414), アラビカコーヒー *C. arabica* CTgS1(AB054842), チャ *Camellia sinensis* TCS1(AB031280), イラワジェンシス種チャ *C. irrawadiensis* ICS1(AB056108), ココアチャ *C. pitilophylla* PTS1(AB2078170), ヤブツバキ *C. japonica* CjCS1(AB297451), ココア *Theobroma cacao* BTS1(AB096699), ガラナ *Paullinia cupana* var. *sorbilis* PcCS(BK008796), ベラドンナ *Atropa belladonna* AbSAMT(AB049752), キンギョソウ

Antirrhinum majus AmSAMT(AF515284), キンギョソウ *A. majus* AmBAMT(AF198492), シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* AtBSMT1(BT022049), シロイヌナズナ *A. thaliana* AtGAMT1(NM118775), シロイヌナズナ *A. thaliana* AtIAMT(AK175586), シロイヌナズナ *A. thaliana* AtJAMT(AY008434), サンジソウ *Clarkia breweri* CbSAMT(AF133053), タバコ *Nicotiana glauca* NgSAMT(GU169286), タバコ *N. suaveolens* NsBSMT(AJ628349), イネ *Oryza sativa* OsBSMT1(XM467504), イネ *O. sativa* OsIAMT1(EU375746), トウモロコシ *Zea mays* ZmAAMT(NM001195208).

結果と考察

カフェイン

プリンアルカロイドの一種であるカフェイン(1,3,7-トリメチルキサンチン)とテオブロミン(3,7-ジメチルキサンチン)はコーヒー, チャ, コーラ, ガラナ, マテ, およびカカオなどに含まれることで良く知られている (Ashihara and Crozier, 1999). 主要な生合成経路を図1に示した (Ashihara and Crozier, 1999). チャやコーヒーにおけるこの生合成経路は基質特異性の高い *N*-メチルトランスフェラーゼによって触媒される (Kato et al., 1999; Kato et al., 2000; Mizuno et al., 2003a; Mizuno et al., 2003b; Uefuji et al., 2003). 植物におけるカフェイン生合成はプリン塩基のメチル化によって制御されていると考えられる (Fujimori et al., 1991). カフェイン生合成における *N*-メチルトランスフェラーゼの役割は, チャ葉から抽出した粗酵素液を用いた実験ではじめて報告された (Suzuki et al., 1976). チャやコーヒーの *N*-メチルトランスフェラーゼは非常に不安定であり, そのためその酵素の精製は困難を極める. Kato ら (1999) はチャ若葉からカフェイン生合成に関与する *S*-アデノシルメチオニン依存性の *N*-メチルトランスフェラーゼの高純度精製に世界ではじめて成功した. この酵素をカフェインシンターゼ (EC 2.1.1.160) と命名した. カフェインシンターゼはモノメチルまたはジメチルキサンチンの 1-

N-および 3-*N*-のメチル化を触媒する. モノまたはジメチルキサンチンの中で, パラキサンチンが最もよい基質であった. カフェインシンターゼの基質としてジメチルキサンチンを用いた場合, パラキサンチンが最もよい基質であり, 次いでテオブロミンであった. 3種類のモノメチルキサンチンのうち, 7-メチルキサンチンの 3-*N*-メチル化を好んで触媒する. しかし, カフェイン生合成経路中でパラキサンチンを経由するのはマイナーな反応経路と考えられている (Kato et al., 1999).

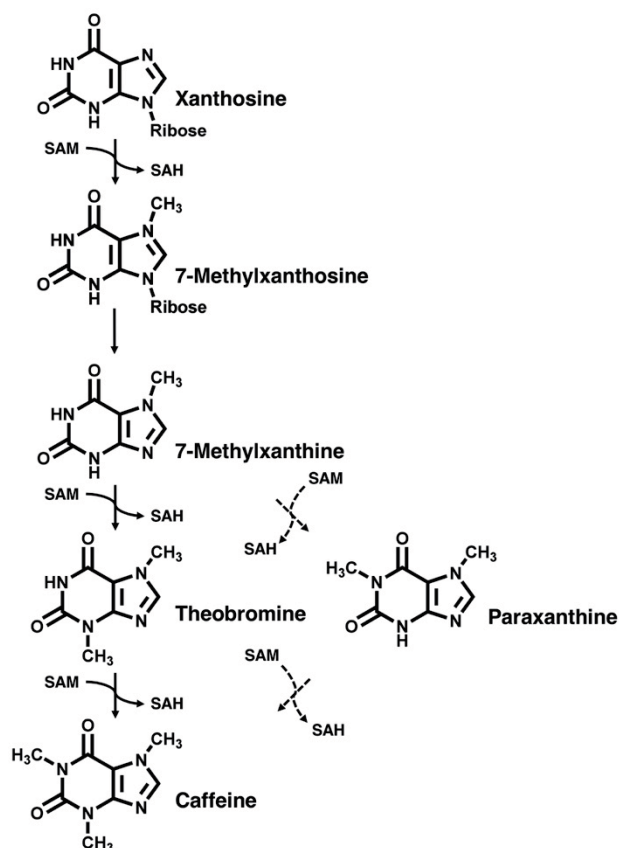


図1 カフェインおよびテオブロミンの生合成経路

実線の矢印は主要な, 破線の矢印は非主流の生合成経路を示す.

カフェインシンターゼ

チャ葉由来カフェインシンターゼ遺伝子は *TCSI* と名づけられ, 1,438塩基対から成り 369アミノ酸残基をコードしている (Kato et al., 2000). *TCSI* の単離はプリンアルカロイド生合成に関係する遺伝子の研究の突破口となった. *TCSI* の塩基配列情報を用いてアラビカコーヒー (*Coffea*

arabica) より同様の機能を有する酵素遺伝子の単離に成功した。コーヒー由来の遺伝子の組換え型酵素を用いた研究でカフェイン合成に関わる3種類のメチルトランスフェラーゼを見いだした。*CCS1*, *CtCS7* および *CaDXMT1* は *TCS1* に類似の活性を有し (Mizuno et al., 2003a; Uefuji et al., 2003), *CmXRS1* と *CaXMT* は 7-メチルキサンチンシンターゼ (EC 2.1.1.158) 遺伝子として見いだされた (Mizuno et al., 2003b; Uefuji et al., 2003)。7-メチルキサンチンシンターゼはキサンチンの7-N位のメチル化に特異的で、キサンチンや他のモノメチルキサンチンあるいは時メチルキサンチンを基質に取らない。カネフォラコーヒー (*Coffea canephora*) の 7-メチルキサンチンシンターゼはヌクレオシダーゼ活性も有し、7-メチルキサンチンから 7-メチルキサンチンを生じる反応も触媒するとの報告があるが (McCarthy and McCarthy, 2007), Uefuji ら (2003) はその活性は、

組換え型粗酵素と精製した組換え型酵素の両方で大腸菌由来の抽出物中に含まれるヌクレオシドホスホリラーゼの存在による可能性を示唆している。近年, McCarthy と McCarthy (2007) による検証の結果, 7-メチルキサンチンシンターゼの主生成物は7-メチルキサンチンではなくて7-メチルキサンチンであると報告している (Ashihara et al., 2017)。実際, 我々の検証においても精製した組換え型酵素では 7-メチルキサンチンではなくて 7-メチルキサンチンを生じることを確認している。このように, N-メチルキサンチンヌクレオシダーゼは, チャと同様コーヒーにおいても独立して存在すると考えられる。*CTS1*, *CTS2*, *CaMXMT1*, および *CaMXMT2* はテオブロミンシンターゼ (EC 2.1.1.159) 遺伝子であり, テオブロミンを生成する唯一の基質として7-メチルキサンチンをとる (Mizuno et al., 2003b; Ogawa et al., 2001)。さらに近年, Mizuno らはプ

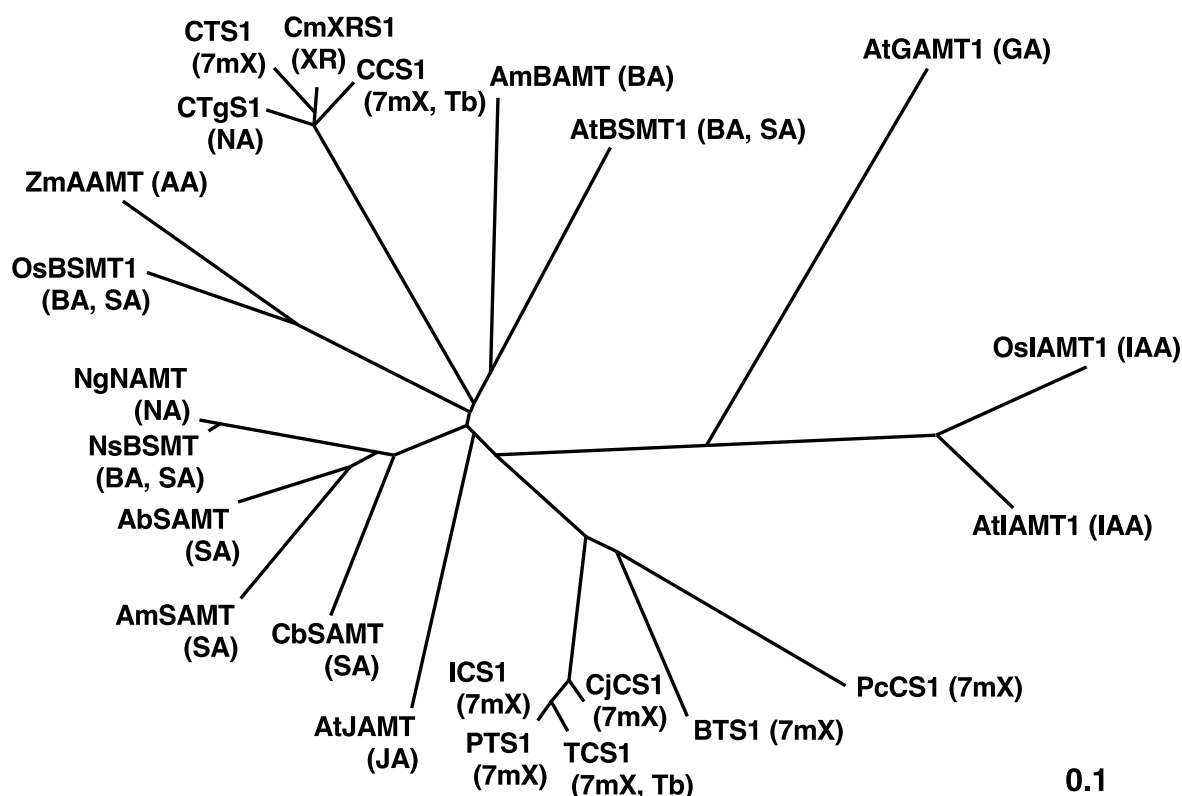


図2 モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの分子系統樹

カッコ内に基質を示した。基質の略号は以下のとおりとする。XR, キサンチン; 7mX, 7-メチルキサンチン; Tb, テオブロミン; NA, ニコチン酸; SA, サリチル酸; BA, 安息香酸; JA, ジャスモン酸; GA, ジベレリン酸; IAA, インドール酢酸; AA, アンスラニル酸。

リンアルカロイドの生合成を司る酵素群と近縁の機能を有するトリゴネリンシンターゼをコードするパラログ遺伝子, *CTgSI* と *CTgS2* の単離に成功した (Mizuno et al., 2014) .

モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーにカフェインシンターゼは属する

カフェインシンターゼとテオブロミンシンターゼ, 7-メチルキサントシンシンターゼはモチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーに属する. これはアミノ酸配列中にモチーフ B' と YFFF 領域を持ち, SABATH ファミリーとも称される (D'Auria et al., 2003) . S-アデノシルメチオニン (SAM) の結合に関わる 3ヶ所の保存領域, モチーフ A, B, および C は, 多くの植物由来の SAM-依存性 O-メチルトランスフェラーゼが有するとして既に報告がある (Joshi and Chiang, 1998) . しかしながら我々の解析の結果, モチーフ B' と YFFF 領域は本酵素ファミリーに特徴的であり, カフェインシンターゼ類酵素もこれに新たに属する酵素の一つである (Kato and Mizuno, 2004) . モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの中で最初に解析されたのが, サンジソウ (*Clarkia breweri*) 由来サリチル酸カルボキシメチルトランスフェラーゼ (CbSAMT) である (Ross et al., 1999; Zubieta et al., 2003) . CbSAMT のアミノ酸配列は CCS1 のそれと約 40%の相同性を示す. モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの多くの酵素は, カルボキシル基を持つメチル基受容体となる基質への SAM を用いた低分子メチルエステル化物の生成を触媒する. 例えば, このファミリーに属するカルボキシメチルトランスフェラーゼは, 安息香酸メチルトランスフェラーゼ (BAMT) (Dudareva et al., 2000) , ジャスモン酸カルボキシメチルトランスフェラーゼ (JAMT) (Seo et al., 2001) , インドール酢酸メチルトランスフェラーゼ (IAAMT) (Zhao et al., 2008) , ジベレリンメチルトランスフェラーゼ (GAMT) (Varbanova et al., 2007) , アンスラニル酸メチルトランスフェラーゼ (AAMT) (Köllner et al., 2010) などが知られている. このファミリー

に属する N-メチルトランスフェラーゼの基質は知られている中ではプリンアルカロイド (Ashihara et al., 1999; Ashihara et al., 2017; Fujimori et al., 1991; Ishida et al., 2009; Kato et al., 1999; Kato et al., 2000; McCarthy and McCarthy, 2007; Mizuno et al., 2003a; Mizuno et al., 2003b; Ogawa et al., 2001; Schimpl et al., 2014; Suzuki et al., 1976; Uefuji et al., 2003; Yoneyama et al., 2006) とニコチン酸 (Mizuno et al., 2014) に限定されている. モチーフ B' メチルトランスフェラーゼファミリーの分子系統樹を図2に示した. その結果からコーヒー, チャ, カカオ, およびガラナにおけるカフェイン生合成に関わる酵素が, 互いに平行進化的に生じたと推測された.

参考文献

- Ashihara H and Crozier A. (1999). Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Adv. Bot. Res.*, 30, 117–205.
- Ashihara H, Mizuno K, Yokota T and Crozier A. (2017). Xanthine alkaloids: Occurrence, biosynthesis, and function in plants. *Progress in the chemistry of organic natural products*. Springer. 105, 1-88
- D'Auria JC, Chen F and Pichersky E. (2003). The SABATH family of MTs in *Arabidopsis thaliana* and other plant species. In *Recent Advances in Phytochemistry*. Romeo JT. (Ed). 37, 253–283, Elsevier Science, Oxford, UK.
- Dudareva N, Murfitt LM, Mann CJ, Gorenstein N, Kolosova N, Kish CM, Bonham C and Wood K. (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell*, 12, 949–961.
- Fujimori N, Suzuki T and Ashihara H. (1991). Seasonal variations in biosynthetic capacity for the synthesis of caffeine in tea leaves. *Phytochem.*, 30, 2245-2248
- Ishida M, Kitao N, Mizuno K, Tanikawa N and Kato M. (2009). Occurrence of theobrominesynthase genes in purine alkaloid-free species of *Camellia*

- plants. *Planta*, 229, 559–568.
- Joshi CP and Chiang VL. (1998). Conserved sequence motifs in plant *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol. Biol.*, 37, 663–674.
- Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Iwama M, Irie M, Crozier A and Ashihara H. (1999). Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol.*, 120, 579–586.
- Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T and Ashihara H. (2000). Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature*, 406, 956–957.
- Kato M and Mizuno K. (2004). Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Front. in Biosci.*, 9, 1833–1842.
- Köllner TG, Lenk C, Zhao N, Seidl-Adams I, Gershenzon J, Chen F and Degenhardt J. (2010). Herbivore-induced SABATH methyltransferases of maize that methylate anthranilic acid using *S*-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiol.* 153, 1795–1807.
- McCarthy AA and McCarthy JG. (2007). The structure of two *N*-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol.*, 144, 879–889.
- Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara A and Fujimura T. (2003). Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthosine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett.*, 534, 75–81.
- Mizuno K, Kato M, Irino F, Yoneyama N, Fujimura T and Ashihara H. (2003). The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7-methylxanthosine synthase is closely homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett.*, 547, 56–60.
- Mizuno K, Matsuzaki M, Kanazawa S, Tokiwano T, Yoshizawa Y and Kato M. (2014). Conversion of nicotinic acid to trigonelline is catalyzed by *N*-methyltransferase belonged to motif B' methyltransferase family in *Coffea arabica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 452, 1060–1066.
- Ogawa M, Herai Y, Koizumi N, Kusano T and Sano H. (2001). 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants. Gene isolation and enzymatic properties. *J. Biol. Chem.*, 276, 8213–8218.
- Ross JR, Nam KH, D'Auria JC and Pichersky E. (1999). *S*-Adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, an enzyme involved in floral scent production and plant defense, represents a new class of plant methyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 367, 9–16.
- Schimpl FC, Kiyota E, Mayer JLS, Goncalves JFC, da Silva JF and Mazzafera P. (2014). Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. *Phytochem.*, 105, 25–36.
- Seo HS, Song JT, Cheong JJ, Lee YH, Lee YW, Iwang I, Lee JS and Choi YD. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 98, 4788–4793.
- Suzuki T and Takahashi E. (1976). Caffeine biosynthesis in *Camellia sinensis*. *Phytochem.*, 15, 1235–1239.
- Uefuji H, Ogita S, Yamaguchi Y, Koizumi N and Sano H. (2003). Molecular cloning and functional characterization of three distinct *N*-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant Physiol.*, 132, 372–380.
- Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, Yu F, Jikumaru Y, Ross J, Cortes D, Ma CJ, Noel JP, Mander L, Shulaev V, Kamiya Y, Rodermeil S, Weiss D and Pichersky E. (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell*, 19, 32–45.
- Yoneyama N, Morimoto H, Ye CX, Ashihara H, Mizuno K and Kato M. (2006). Substrate

specificity of N-methyltransferase involved in purine alkaloids synthesis is dependent upon one amino acid residue of the enzyme. *Mol. Gen. Genom.*, 275, 125–135.

Zhao N, Ferrer JL, Ross J, Guan J, Yang Y, Pichersky E, Noel JP and Chen F. (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the SABATH family. *Plant Physiol.*, 146, 455–467.

Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E and Noel JP. (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell*, 15, 1704–1716.

〔 令和 2 年 2 月 29 日 受付 〕
〔 令和 2 年 3 月 9 日 受理 〕

The Molecular Evolution of Caffeine Biosynthetic Enzymes Caffeine biosynthetic enzymes belonging to the motif B' methyltransferase family

Kouichi Mizuno¹

¹ *Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) and theobromine (3,7-dimethylxanthine) are well-known purine alkaloids in *Coffea*, *Camellia*, *Cola*, *Paullinia*, *Ilex*, and *Theobroma* spp. The caffeine biosynthetic pathway depends on the substrate specificity of *N*-methyltransferases, which are members of the motif B' methyltransferase family. The caffeine biosynthetic pathways in purine alkaloid-containing plants might have evolved parallel to one another, which is consistent with the different catalytic properties of the enzymes involved in these pathways. In this paper, we discuss how these enzyme genes evolved in the motif B' methyltransferase family.

Keywords: caffeine, methyltransferase, coffee, molecular evolution, molecular phylogenetic tree, trigonelline