

講演番号：3E7p09

講演日時：3月26日 15:28～ 1号館 E7 会場

コーヒー原種 *Coffea stenophylla*、*C. millotii*、*C. pseudozanguebariae* からのカフェイン生合成系酵素遺伝子の単離と機能解析

Isolation and characterization of caffeine synthase genes from wild coffee.

○國久 葉月¹、高木 駿¹、倉田 陸朗¹、Valerie Poncet²、Alexandre de Kochko²、水野 幸一¹ (¹秋田県大生物資源、²IRD-Montpellier DIADE)

○Hazuki KUNIHISA¹、Hayao TAKAGI¹、Rikuro KURATA¹、Valerie Poncet²、Alexandre de Kochko²、Kouichi MIZUNO¹ (¹Akita Prefectural Univ. Faculty of Bioresource Sciences, ²IRD-Montpellier DIADE)

[背景・目的] IRD-モンペリエで維持している *Coffea* 属原種コレクションの中で、主要3品種を含む15原種を研究材料として用いることとした。これらのコーヒー原種を材料として、これまでの研究で解析の進んでいる *Coffea arabica* 由来のカフェイン生合成系酵素遺伝子群に相当するものを単離し比較・解析する。以上より *Coffea* 属の中でどのようにしてカフェイン合成能が獲得され、発展してきたのか、その分子進化を探る。今回は、カフェイン含量が *C. arabica* と同程度である *C. stenophylla*、カフェイン含量がきわめて少ないことが知られている *C. millotii* および *C. pseudozanguebariae* より、カフェイン生合成系酵素遺伝子を単離したので報告する。

[方法] *Coffea* 属原種の若葉より全RNAを抽出し、その一部からcDNAを合成した。これを鋳型とし、*C. arabica* のカフェイン生合成関連酵素の遺伝子情報と機能解析の結果をもとに設計したプライマーを用い、PCRにてそれらの遺伝子の単離を試みた。単離した遺伝子の配列を *C. arabica* 由来の既知遺伝子と比較し分類した。さらに大腸菌を用いた発現系を構築し、組換え型タンパク質を得た。これを用いてカフェイン前駆体である種々のキサンチン誘導体またはニコチン酸を基質として反応させ、生成物を液体シンチレーションカウンターまたはTLCにて検出した。

[結果・考察] *C. stenophylla* の若葉由来cDNAよりカフェイン生合成関連酵素遺伝子と高い相同性を有する5種の遺伝子の単離に成功し、それぞれ *Cst-tmXRS1*、*Cst-tmXRS2*、*Cst-tTS*、*Cst-tCS1* および *Cst-tTgS1* と命名した。同様に *C. millotii* から2種(*Cmi-tTgS1* および *Cmi-tTgS2*)、*C. pseudozanguebariae* から4種(*Cps-tmXRS1*、*Cps-tCS1*、*Cps-tTgS1* および *Cps-tTgS2*)の単離に成功した。いずれも全長1200bp程度であり、対応する *C. arabica* 由来の遺伝子との相同性は塩基レベルで94%以上であった。しかし、*C. millotii* より *CmXRS*、*CTS*、および *CCS* に相当する、*C. pseudozanguebariae* より *CTS* に相当する酵素遺伝子が単離されなかったことから、カフェイン含量の低い品種ではそれらの遺伝子の発現量がきわめて低い、または発現していないと考えられた。さらに、単離遺伝子を含む、これまで知られているカフェイン生合成系酵素遺伝子を網羅した分子系統樹を作成したところ、想定される基質特異性の違いによって4つのクレードに分類された。つぎに単離した遺伝子の組換え型酵素の生産を試み、活性を調べたところ、*Cps-tTgS2* 以外は分子系統樹中の4つのクレードそれぞれに分類される基質特異性を主とした活性を有することを確認した。現在さらに詳しい解析を進めている。

coffee, caffeine, methyltransferase

発表責任者：水野幸一 (koumno@akita-pu.ac.jp)