

カフェイン生合成系を利用する

奈良先端科学技術大学院大学

遺伝子教育研究センター・植物細胞工学部門

佐野 浩

プリンアルカロイドを生合成する植物

Rubiaceae

Coffea arabica (コーヒー)

C. canephora (コーヒー)

Theaceae

Camellia sinensis (茶)

Aquifoliaceae

Ilex paraguariensis (マテ茶)

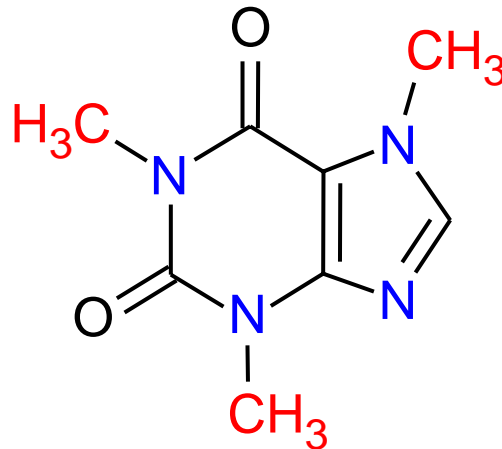
Sapindaceae

Paullinia cupana (ガラナ)

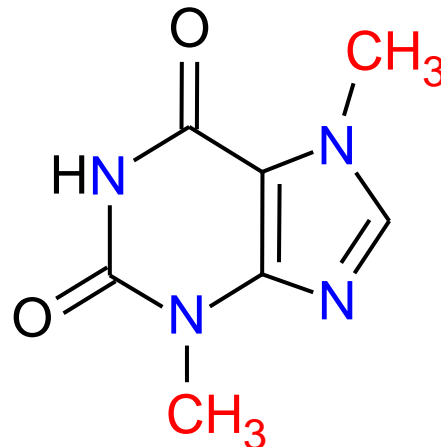
Malvaceae

Cola nitida (コラ)

Theobroma cacao (カカオ)

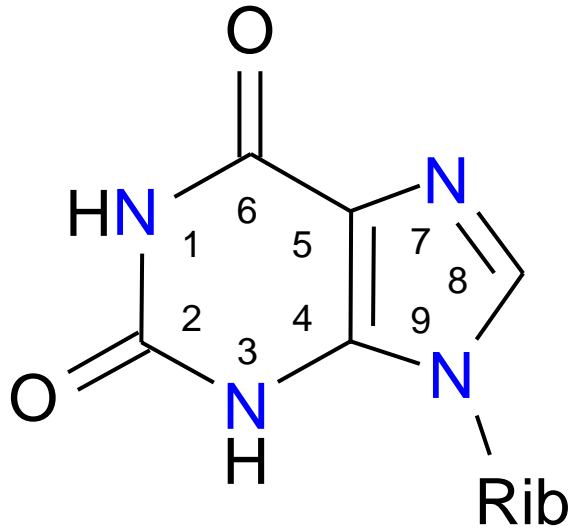


カフェイン

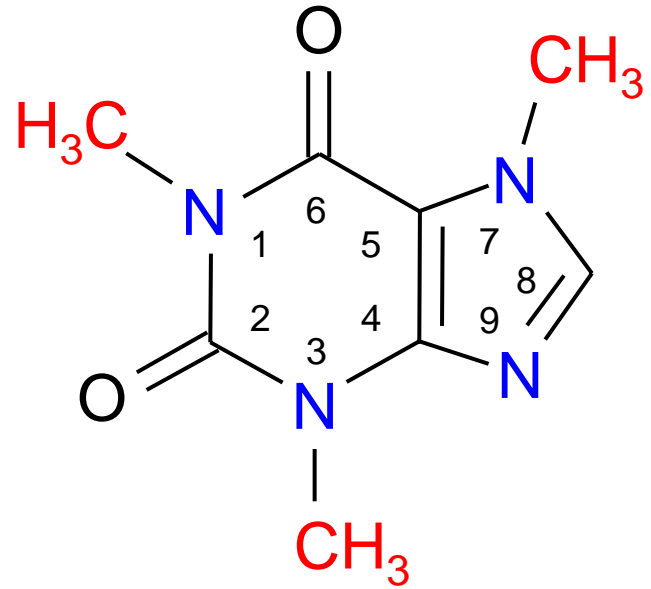


テオブロミン

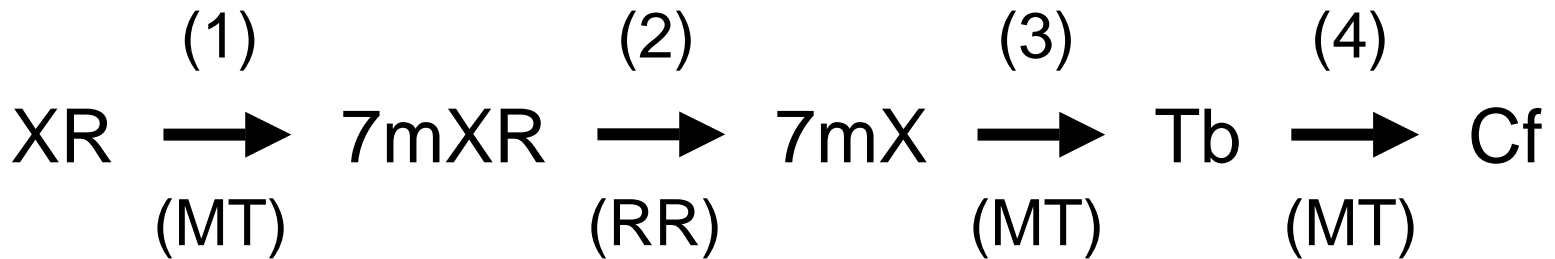
コーヒー植物のカフェイン生合成経路



キサントシン (XR)



カフェイン (Cf)



MT: メチル化反応, RR: 脱リボース反応

既知遺伝子との相同性を利用した cDNA 単離

- 1) 縮重 PCR
 - 2) ライブラリースクリーニング →
 - 3) RT-PCR
- コーヒーノキから 4 種類のメチル化酵素 cDNA を単離した。

```
CaMXMT1 MELQEVLMNEGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79
CaMXMT2 MELQEVLMNEGEGDTSYAKNASYN-LALAKVKPFLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79
CaXMT1 MELQEVLMNEGEGDTSYAKNASAYNLVLAQVKPFVLEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 80
CaDXMT1 MELQEVLMNEGEGDTSYAKNSFYNLFLIRVKPFILEQCIRELLRANLPNINKCIKVADLGCASGPNTLLTVRDIVQSID 79
```

```
CaMXMT1 KVGQEEKKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISSAMPGSFYGRLFPEESMHFLHSCYSV 159
CaMXMT2 KVGQEEKKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLISSAMPGSFYGRLFPEESMHFLHSCYSV 159
CaXMT1 KVGQEEKKNELERPTIQIFLNDLFPNDFNSVFKLLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLIGSAMPGSFYSRLFPEESMHFLHSCYCL 160
CaDXMT1 KVGQEEKKNELERPTIQIFLNDLFQNDFNSVFKSLPSFYRKLEKENGRIKIGSCLIGSAMPGSFYGRLFPEESMHFLHSCYCL 159
```

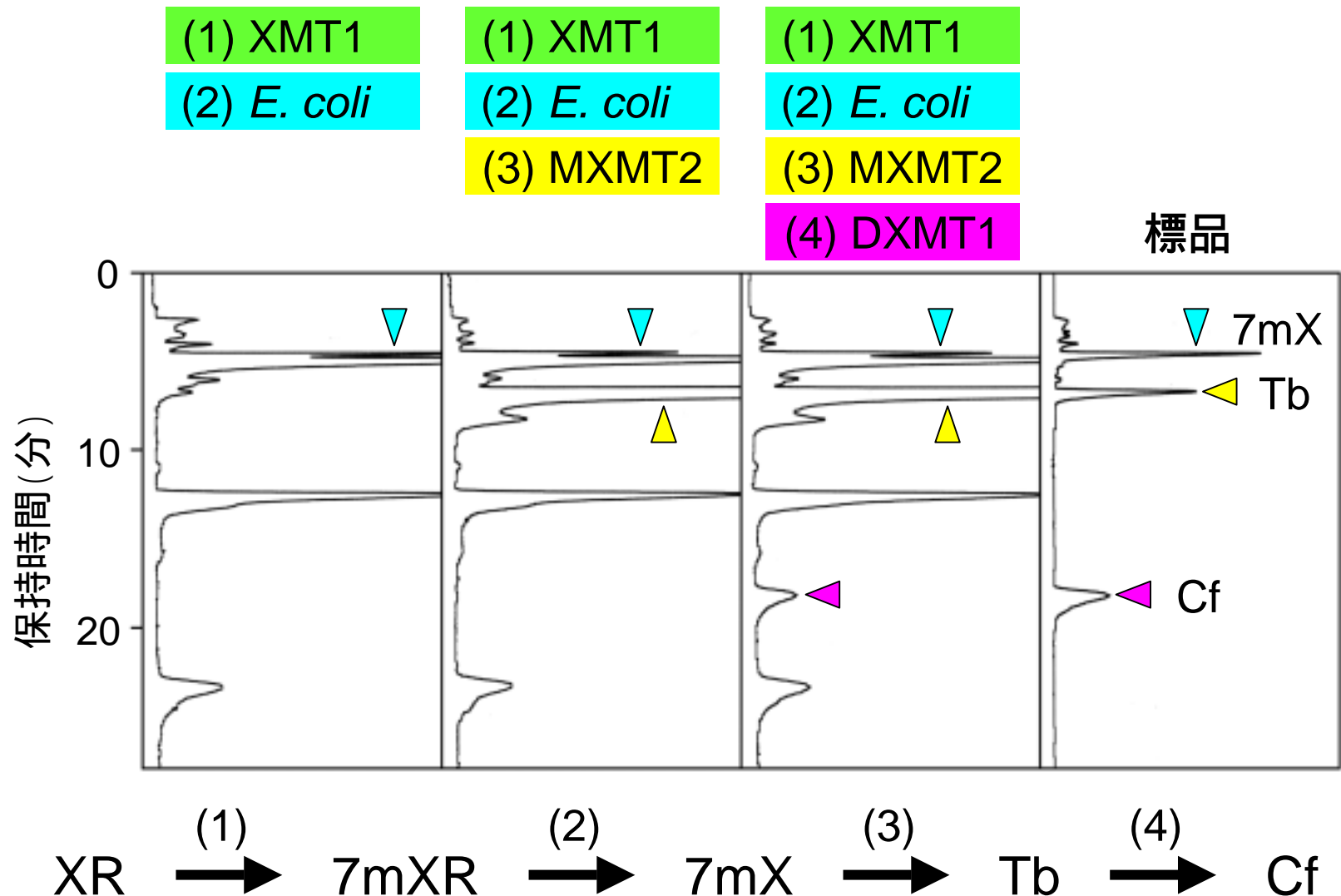
```
CaMXMT1 HWLSQVPSGLVIELGIGANKGSIYSSKGCRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSKELFSRGRMLLTCICKVDEFDEFNPLD 239
CaMXMT2 HWLSQVPSGLVIELGIGANKGSIYSSKASRPPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSKELFSRGRMLLTCICKVDEYDEFNPLD 239
CaXMT1 QWLSQVPSGLVTELGISTNKGSIYSSKASRLPVQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSELFSHGRMLLTCICKGVELDARNAID 240
CaDXMT1 HWLSQVPSGLVTELGISANKGCIYSSKASRPPHQKAYLDQFTKDFTTFLRIHSELTSRGRMLLTWICKEDEFENPNSID 239
```

```
CaMXMT1 LLDMAINDLIVEGLLEEEKLDSFNLPFFTPSABEVKCIVEEEGSCEILYLETFKAHYDAAFSIDDYPVR-----SHEQ 313
CaMXMT2 LLDMAINDLIVEGHLEEEKLASFNLPFFTPSABEVKCIVEEEGSFEILYLETFKAHYDAGFSIDDYPVRSHFQVYGDEH 319
CaXMT1 LLEMAINDLIVEGHLEEEKLDSFNLPVYIPSABEVKCIVEEEGSFEILYLETFKVLYDAGFSIDD-----EH 310
CaDXMT1 LLEMSINDLVIEGHLEEEKLDSFNVPIYAPSTEEVKCIVEEEGSFEILYLETFKVPYDAGFSIDDYQGRSHSPVSCDEH 319
```

```
CaMXMT1 IKAEYVASLIRSVYEPILASHFGEAIMPDLFHRLAKHAAKVLHMGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 378
CaMXMT2 IKAEYVASLIRSVYEPILASHFGEAIMPDLFHRLAKHAAKVLHLGKGCYNNLIISLAKKPEKSDV 384
CaXMT1 IKAEYVASSVRAVYEPILASHFGEAIPDFHRPAKHAAKVLPLGKGFYNNLIISLAKKPEKSDV 372
CaDXMT1 ARAAHVASSVRSIFEPIVASHFGEAIMPDLSHRLAKNAAKVLRSGKGFYDSLIISLAKKPEKSDV 384
```

試験管内でのカフェイン生合成経路の再構成

- ・ 組換えメチル化酵素と大腸菌抽出物を用いて酵素反応を行った。



減カフェインコーヒー植物の創出への期待

- カフェインの副作用

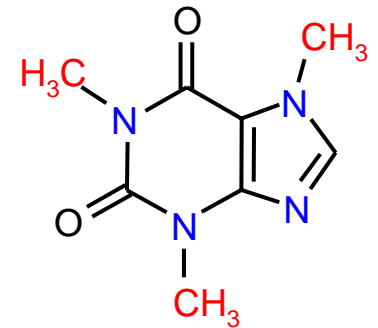
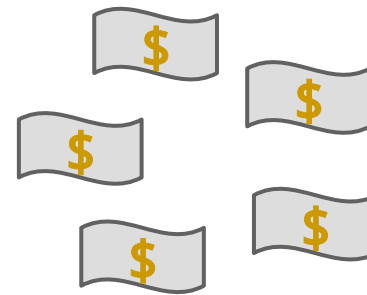
- ・ 不眠
- ・ 不整脈

- カフェイン抽出溶媒

- ・ 水 (Swiss Water Process)
- ・ 有機溶媒
- ・ 超臨界二酸化炭素

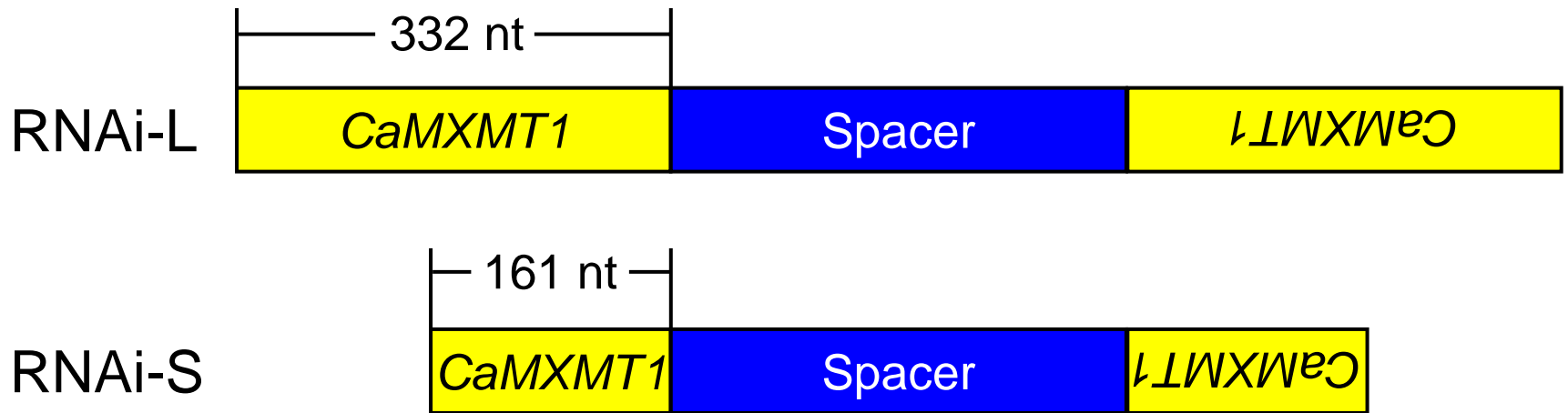
- 従来のデカフェコーヒーの短所

- ・ 生産コストが高い

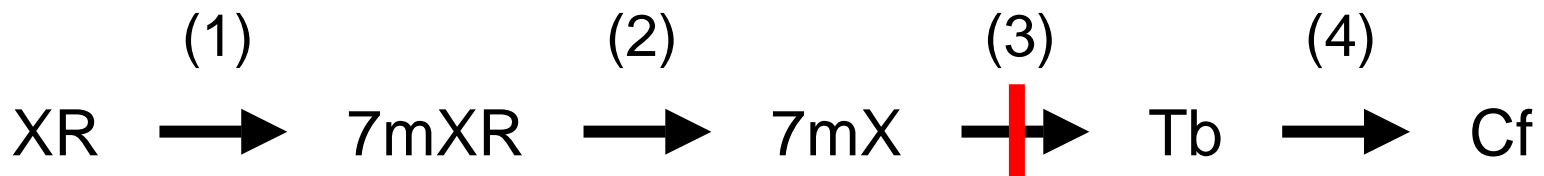


減カフェインコーヒー植物の分子育種

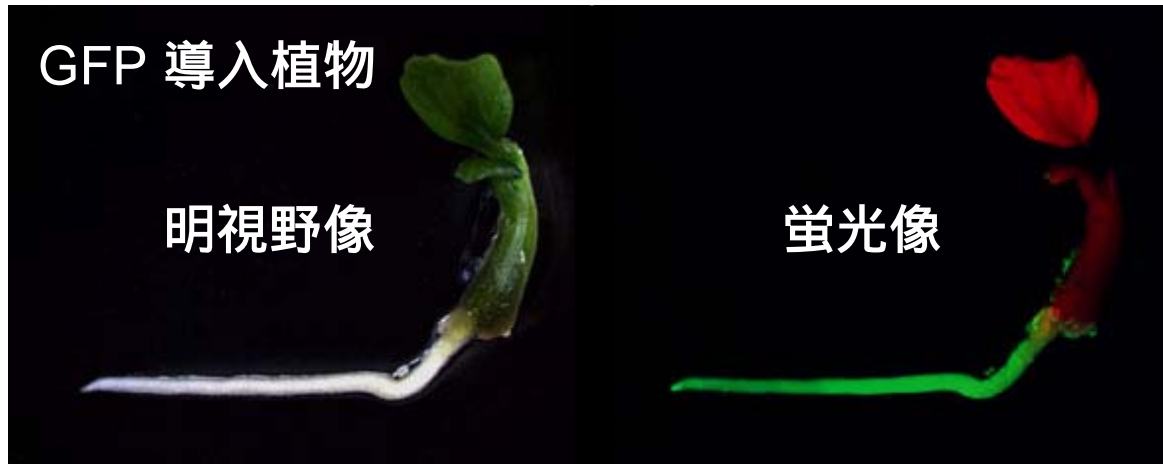
RNAi コンストラクト



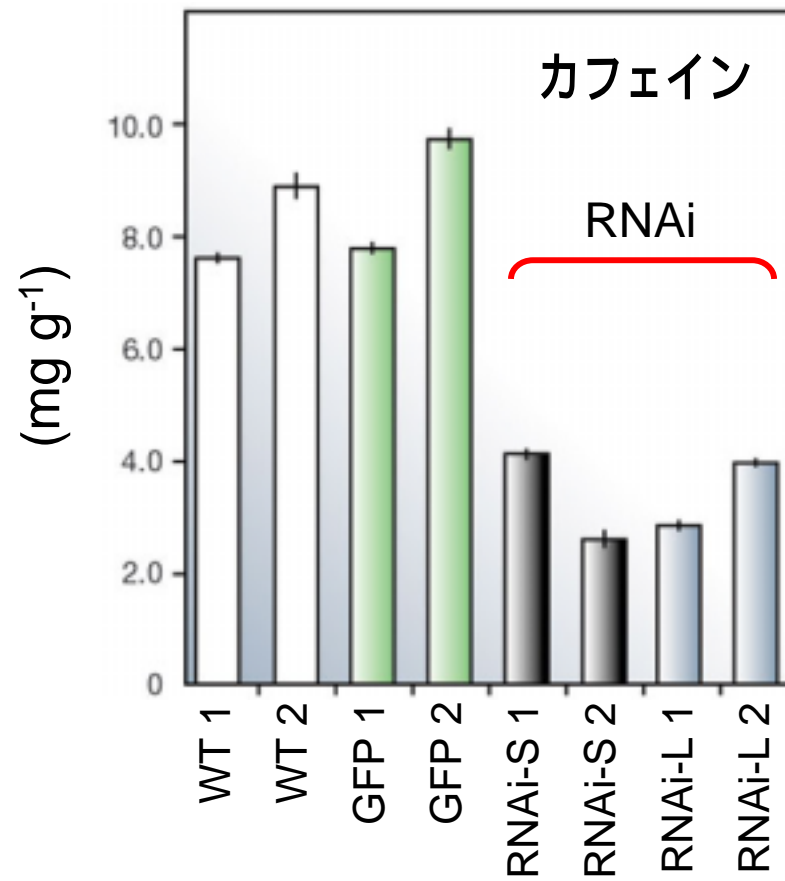
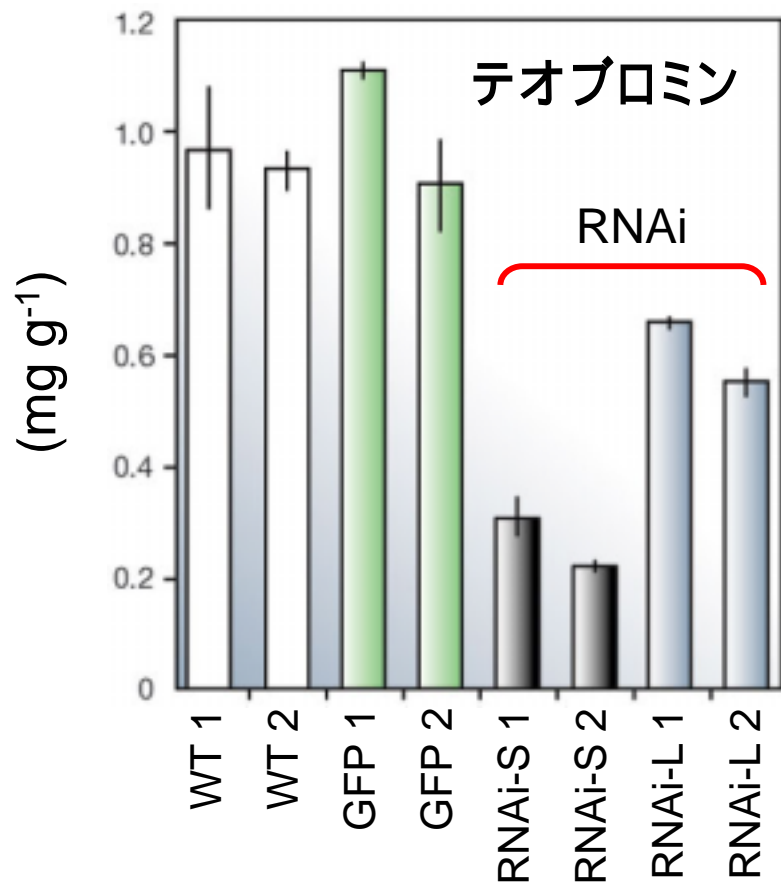
- ・ RNAi によって (3) のメチル化反応を抑制する。



コーヒー植物(カネフォラ種) 個体再生系の確立



RNAi コーヒー植物 (カネフォラ種)

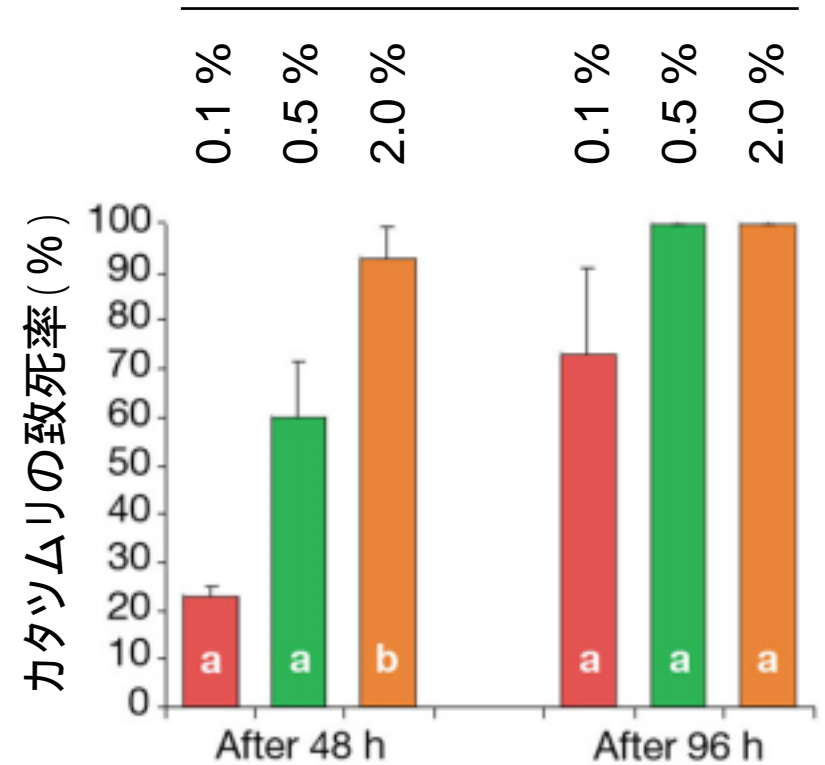


カフェインの忌避活性と殺虫活性

ナメクジに対する忌避活性

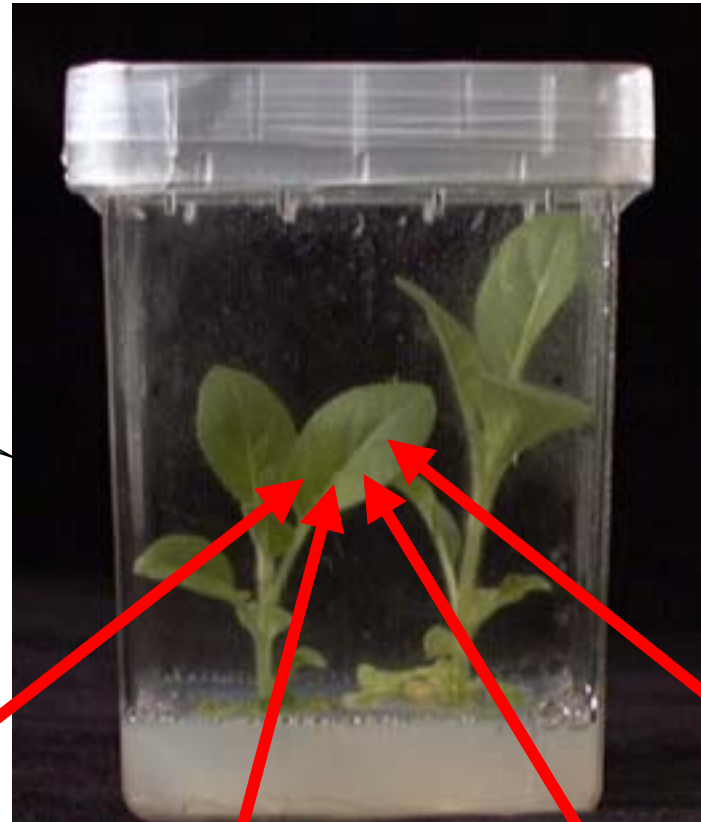


カフェイン局所処理



一般作物におけるカフェイン生合成経路の構築

病害虫の
防除



新規カフェイン
製造原料の創出

