

氏名(本籍)	ね 根	ぎし 岸	おさむ 紀	(埼玉県)
学位の種類	農 学 博 士			
学位記番号	博 甲 第 275 号			
学位授与年月日	昭和60年3月25日			
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
審査研究科	農学研究科 応用生物化学専攻			
学位論文題目	カフェイン生合成に関する研究			
主査	筑波大学教授	農学博士	今 川	弘
副査	筑波大学教授	農学博士	安 井	恒 男
副査	筑波大学教授	理学博士	新 井	勇 治
副査	筑波大学教授	理学博士	鈴 木	恕

論 文 の 要 旨

カフェイン(1, 3, 7-トリメチルキサンチン)はチャおよびコーヒーの品質に関係する主要な成分であるが、種々の生理作用をもつために薬品や清涼飲料に利用されている。

植物におけるカフェインの生合成に関する研究は比較的少なく、これまでに7-メチルキサンチンから7-メチルキサンチン、テオプロミン(3, 7-ジメチルキサンチン)を経て合成されることが明らかにされている。しかし、7-メチルキサンチンに至る経路については、プリンヌクレオチドから由来することが推定されているのみで、あとは全く不明であった。

本研究はこの未知の部分、特に「最初のメチル化がどこでおこるか」という問題やヌクレオチド代謝との関係を明らかにすることによって生合成の全貌を解明しようとするものである。まず、種々の¹⁴C標識化合物を用いるトレーサー実験を行い、次にメチルトランスフェラーゼやヌクレオシダーゼなど生合成関連酵素の性質を調べた。

(1) ¹⁴C標識化合物を用いるカフェイン生合成経路の検討

まず、チャの新芽に〔8-¹⁴C〕アデニンを吸収させ、経時的に茶芽の酸可溶性区分中のプリン化合物への取り込みを調べた。アデニンの¹⁴Cは遊離のヌクレオチドおよびカフェインなどメチルキサンチンによく取り込まれた。標識されたヌクレオチドとしてはAMP, ADP, ATPが主要なものであったので、次にAMP, ADP, ATP, IMP, GMPの¹⁴C標識化合物を茶芽に吸収させた。いずれも¹⁴Cはカフェインによく取り込まれた。これらの結果から、ヌクレオチドがカフェインへ変換することが確認できたが、最初のメチル化の段階は明らかにできなかった。そこで最初に生ずるメチル

化合物を検出するために、メチル基を¹⁴Cで標識したメチオニンを茶芽に吸収させた結果、7-メチルキサントシンが初期の主な生成物として同定された。この実験で、メチル化プリンヌクレオチドの存在は認められなかったため、本化合物が最初のメチル化物であり、これはキサントシンのメチル化によって生ずる可能性が高くなった。実際に〔2-¹⁴C〕キサントシンの¹⁴Cはカフェインへ高率で取り込まれたので、これから7-メチルキサントシンを経由してカフェインに至る経路が推定できた。

さらに、キサントシンの前駆体としてはXMP、イノシンなどが考えられるので、これらの¹⁴C標識化合物を茶芽に与えたところ、XMPは速やかにキサントシンに変わり、さらにカフェインへと変換したが、アデノシンとイノシンはいずれもまずヌクレオチドに変換してからAMPやIMPと同様なパターンでカフェインへ取り込まれた。従ってXMPがキサントシンの前駆体であり、これらのヌクレオチドは直接キサントシンへは変換せず、主にサルベージ経路でヌクレオチドになってから、カフェイン生合成系へ入っていくものと判断された。

コーヒー植物の若枝でもアデニン、キサントシンおよびXMPの¹⁴Cは、茶芽の場合と同様なパターンでカフェインに取り込まれることを認めた。

次に、カフェイン生合成にはヌクレオチド代謝が密接に関係しているため、茶芽を用いて標識化合物吸収後のヌクレオチド間の変換の様子を調べた。アデニン、アデニンヌクレオチド、イノシンおよびIMPの¹⁴Cは、いずれも速やかに主としてAMP、ADPおよびATPに入り、三者がほぼ同じ割合で変化した。XMPとGMPはいずれもGDPとGTPのみに取り込まれ、アデニンヌクレオチドには全く変換しなかった。

(2) カフェイン生合成関連酵素の性質の究明

チャおよびコーヒー植物への標識化合物の取り込み実験から、キサントシンをメチル化して7-メチルキサントシンを生成するN-メチルトランスフェラーゼと、7-メチルキサントシンを分解して7-メチルキサンチンを生成する酵素の存在が示唆された。よってこれらの酵素の確認と性質の究明を行った。

茶葉から無細胞抽出液を調製して、20°CでS-アデノシル-L-[メチル-¹⁴C]メチオニンとキサントシンの混合液にこの抽出液を加えて反応させると、キサントシンはN-7位でメチル化され7-メチルキサントシンに速やかに変換し、一部は7-メチルキサンチンに分解した。30°Cの条件では7-メチルキサンチンの生成速度が速く、さらにテオブロミンとカフェインの生成も認められ、この無細胞抽出液を用いた実験からも、前記の取り込み実験から推定した経路を支持する結果が得られた。

新たに見出されたN-メチルトランスフェラーゼは至適pHを7.5~8.0に持ち、熱に非常に不安定な酵素であった。プリンヌクレオチド、ヌクレオチドおよび塩基のうちN-メチルトランスフェラーゼによってN-7位がメチル化されたのは、キサントシンだけであった。この結果より、キサントシン→7-メチルキサントシンがカフェイン生合成における最初のメチル化反応であることが立証された。

次に、7-メチルキサントシンを分解する酵素(N-メチルヌクレオシダーゼ)を茶葉抽出液から分離精製した。DEAE-セルロースカラムで、既知のアデノシンヌクレオシダーゼとは異なる位置に活性区分が溶出されたので、これをさらにゲル濾過で精製した。得られた酵素は至適 pH が8.0~8.5にあり、分子量は約6万と推定された。プリンヌクレオシドとそのメチル化物16種類に対する分解活性を調べた結果、本酵素は3および7位がメチル化されたヌクレオシドをよく分解するが、1-メチルおよび通常のヌクレオシドに対する活性はないかあるいは小さいことが認められた。一方、アデノシンヌクレオシダーゼはアデノシンと7-メチルアデノシンに高い活性を示したが、7-メチルキサントシンは全く分解せず、他の基質に対しても活性が小さいかあるいは不活性であった。これらの結果から、カフェイン生合成経路上における7-メチルキサントシンの加水分解には、新たに見出されたN-メチルヌクレオシダーゼが関与しているものと判断された。

コーヒー葉の無細胞抽出液中にも茶葉と同様にN-メチルトランスフェラーゼ活性とN-メチルヌクレオシダーゼ活性が確認された。

以上の¹⁴Cトレーサー実験と関連酵素に関する実験から、カフェインの生合成経路がキサントシン→7-メチルキサントシン→7-メチルキサントシン→テオプロミン→カフェインであることを明らかにすることができた。さらに、キサントシンはプリンヌクレオチドからXMPを直接の前駆体として生成することを示した。

審 査 の 要 旨

これまでカフェインのプリン骨格はプリンヌクレオチドに由来することが推定されていたが、ヌクレオチドから7-メチルキサントシンに至る経路は全く不明で、その解明が課題となっていた。

本研究において¹⁴C標識化合物を用いるトレーサー実験および関連酵素からの検討によって、カフェインがXMPからキサントシン、7-メチルキサントシンを経て合成されることを明らかにすることができた。この結果は植物のプリン化合物の代謝に関する新しい成果として評価できる。

この成果は有用物質であるカフェインの培養細胞などによる生産にあたり、有益な指針を与えるものと考えられる。今後、ヌクレオチド代謝とカフェイン生合成との関連およびカフェインの生体内分解に関する研究をさらに進めることにより、植物におけるカフェインの生理的意義の解明への途が開けることが期待される。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものとみとめる。