

植物中的咖啡碱：从合成途径研究到转基因作物

谭礼强¹, 齐桂年^{1,*}, 陈盛相¹, 王丽鸳², 韦康², 成浩^{2,*}

(¹四川农业大学园艺学院, 四川雅安 614025; ²中国农业科学院茶叶研究所茶树改良中心, 杭州 310008)

摘要: 在植物细胞中咖啡碱的核心合成途径为：黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤核苷→7-甲基黄嘌呤→可可碱→咖啡碱，即 3 次顺序甲基化反应和 1 次核糖水解过程。目前已经从茶树等植物中分离出催化上述甲基化反应的酶，并克隆得到编码这些酶的基因。在此基础上，利用 RNAi 干扰和农杆菌介导法等技术，已成功培育出低咖啡碱饮料作物茶树和咖啡以及能合成咖啡碱的烟草和菊花植株。

关键词: 茶树；咖啡植物；咖啡碱；合成途径；N-甲基转移酶；转基因

中图分类号: S 571; Q 946.88 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2012) 09-1849-10

Caffeine in Plants: From Biosynthesis Pathway to Genetically Modified

TAN Li-qiang¹, QI Gui-nian^{1,*}, CHEN Sheng-xiang¹, WANG Li-yuan², WEI Kang², and CHENG Hao^{2,*}

(¹College of Horticulture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 614025, China; ²National Center for Tea Improvement, Tea Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Hangzhou 310008, China)

Abstract: The main caffeine biosynthetic pathway is a sequence consisting of xanthosine → 7-methylxanthosine → 7-methylxanthine → theobromine → caffeine. In recent years, the enzymes and genes involved in caffeine biosynthesis have been isolated from *Camellia* and *Coffea* plants and genetically modified tea and coffee seedlings that producing low caffeine have been developed. Caffeine can also be synthesized in transgenic tobacco and chrysanthemum plants, which do not contain it naturally, for pests control purposes.

Key words: *Camellia sinensis*; *Coffea*; caffeine; biosynthesis; N-methyltransferase; genetically modified

咖啡碱 (caffeine, 1,3,7-三甲基黄嘌呤, 简称 Cf) 是一种重要的嘌呤生物碱, 是茶叶、咖啡和可可等非酒精饮料的功能成分之一, 具有兴奋神经、解除疲劳、散热镇痛、增强记忆等功能, 对一些疾病如帕金森症、II 型糖尿病等有一定的预防作用。然而研究表明, 过量摄入咖啡碱也可能引起失眠、心悸等不良反应以及增加骨质疏松和流产的风险 (吴命燕 等, 2010)。天然合成的咖啡碱分布于近百种植物的叶片或果实中, 其中含量较高的是茶树 (*Camellia sinensis*)、咖啡树 (*Coffea arabica*)、巴拉圭茶 (maté, *Ilex paraguariensis*) 和瓜拿纳泡林藤 (guarana, *Paullinia cupana*) 等饮料作物, 特定部位的含量可达干物质质量的 1%~5% (周晨阳 等, 2011)。

20 世纪 60 年代以来, 咖啡碱在植物细胞中的代谢途径和参与其催化调节的酶一直是学者们研

收稿日期: 2012-04-12; 修回日期: 2012-07-06

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2009GJF00047); 四川省科技厅科技支撑计划项目 (2006-YZGG-8, 2009-NZ0015); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (nycytx-23)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guinian5612@sina.com; chenghao@mail.tricaas.com)

研究的热点。随着生物学研究技术的发展,该领域研究已取得许多重要进展,包括(1)从多角度确证了咖啡碱在植物细胞中的合成途径,(2)分离鉴定了参与相关反应的酶和基因,(3)通过转基因手段已成功培育出低咖啡碱饮料作物茶树和咖啡,同时也可以让原本不含咖啡碱的植物合成咖啡碱。本文将系统地回顾这一研究历程。

1 咖啡碱的生物合成途径

1.1 核心途径

对于咖啡碱的合成途径的研究,是从其自身结构出发,逐步倒推的过程,前期的研究手段多为同位素示踪法。20 世纪 60 年代至 70 年代初,通过观察放射性标记在咖啡或茶树叶片组织中的转移动态,初步确定咖啡碱合成的直接前体是可可碱(theobromine, 3,7-二甲基黄嘌呤, Tb) (Anderson & Gibbs, 1962; Ogotuga & Northcote, 1970; Suzuki, 1973)。1975 年日本学者首次在茶树叶片提取物中检测到可可碱和咖啡碱合成酶活性,通过底物专一性分析,推断出在茶树中咖啡碱是由 7-甲基黄嘌呤(7-methylxanthine, 7mX)途经可可碱合成(Suzuki & Takahashi, 1975)。后来 Baumann 等(1978)观察到在咖啡树叶片中 7-甲基黄嘌呤核苷(7-methylxanthosine, 7mXR)的放射性能转移到咖啡碱中。Waller 等(1983)在咖啡树愈伤组织提取物中检测到 N-核苷水解酶和 N-甲基转移酶活性,证实了在咖啡植物中 7mXR 是合成咖啡碱的前体。在此基础上, Negishi 等(1985)通过大量的示踪试验后首次完整地提出茶树中咖啡碱的合成途径:黄嘌呤核苷(Xanthosine, XR) \rightarrow 7mXR \rightarrow 7mX \rightarrow Tb \rightarrow Cf (图 1)。随后,他们又报道了从茶树叶片中分离得到 N-甲基核苷水解酶,进一步证实了咖啡碱合成途径中由 7mXR 脱核糖得到 7mX 这一步反应(Negishi et al., 1988)。

对此也曾有学者提出不同的观点,认为咖啡植物中合成咖啡碱的直接前体不是可可碱(Nazario & Lovatt, 1993)。但随后 Ashihara 等(1996)针对他们的报道,通过更为细致的试验做出了很好的辩解,从而有力地支持了前人观点。而后来对茶树叶片中咖啡碱合成酶的纯化鉴定(Kato et al., 1999)、

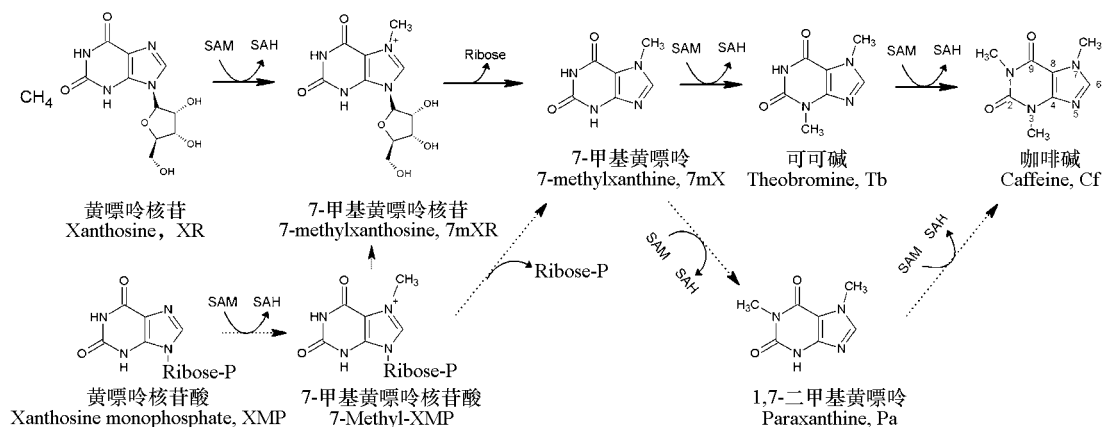


图 1 咖啡碱的生物合成途径

根据 Negishi 等(1985)、Schulthess 等(1996)和 Kato 等(1996)等文献总结。

Fig. 1 The biosynthesis pathways of caffeine in plants

Summarized from the references, e.g. Negishi et al. (1985), Schulthess et al. (1996) and Kato et al. (1996).

体外重组酶咖啡碱合成体系构建 (Uefuji et al., 2003) 以及相关基因沉默试验 (Ogita et al., 2004) 等研究都进一步证实了这一核心合成途径的正确性。目前已经证明该途径在山茶属 (Ashihara et al., 1998; Yoneyama et al., 2006)、咖啡属 (Ashihara & Crozier, 1999)、可可属 (Koyama et al., 2003) 以及冬青属的巴拉圭茶 (Ashihara, 1993) 等含咖啡碱植物中是基本适用的。但同时由于部分酶的底物较为广泛或者有其他次要酶活性的存在, 不同的植物中还存在一些次要途径, 如: 黄嘌呤核苷酸 (xanthosine monophosphate, XMP) \rightarrow 7-甲基黄嘌呤核苷酸 (7-methyl-XMP) \rightarrow 7mX \rightarrow Tb \rightarrow Cf (Schulthess et al., 1996) 和 7mX \rightarrow 1,7-二甲基黄嘌呤 (paraxanthine) \rightarrow Cf (Kato et al., 1996) 等, 如图 1 虚线部分所示。

1.2 嘌呤环和甲基供体途径

咖啡碱中的嘌呤环来源较为复杂。早期的研究结论是咖啡碱中嘌呤环的合成前体来源与其他嘌呤代谢体系是相同的 (Anderson & Gibbs, 1962)。Suzuki 等 (1992) 总结了前人大量研究, 提出用于合成咖啡碱的黄嘌呤核苷可能有 3 个来源: (1) AMP (adenosine monophosphate, 腺嘌呤核苷酸) 大量存在于植物细胞中, 在 4 种外源嘌呤碱基中它是最有效的咖啡碱合成前体, 其转化途径可能为 AMP \rightarrow IMP (inosine monophosphate, 次黄嘌呤核苷酸) \rightarrow XMP \rightarrow XR (Negishi et al., 1992); (2) GMP (guanosine monophosphate, 鸟嘌呤核苷酸) 也参与咖啡碱的合成, 但由于植物细胞中缺乏 GMP 解氨酶 (Stasolla et al., 2003), 它的转化途径可能为 GMP \rightarrow 鸟嘌呤核苷 (guanosine) \rightarrow XR; (3) IMP 也可源于嘌呤碱的从头合成途径, 这部分 IMP 也可能直接参与 XR 的合成。随后同位素示踪试验和相关酶活性的鉴定研究证实了这些 XR 供体途径的存在 (Negishi et al., 1994; Schulthess et al., 1996; Ito & Ashihara, 1999; Keya et al., 2003)。另外 Koshiishi 等 (2001) 研究发现甲硫氨酸循环为咖啡碱合成提供甲基时, 释放出的腺苷也可以直接或间接转化为 AMP, 从而参与咖啡碱的合成, 这成为 XR 的第 4 条来源途径。上述 4 条途径分别如图 2 所示。

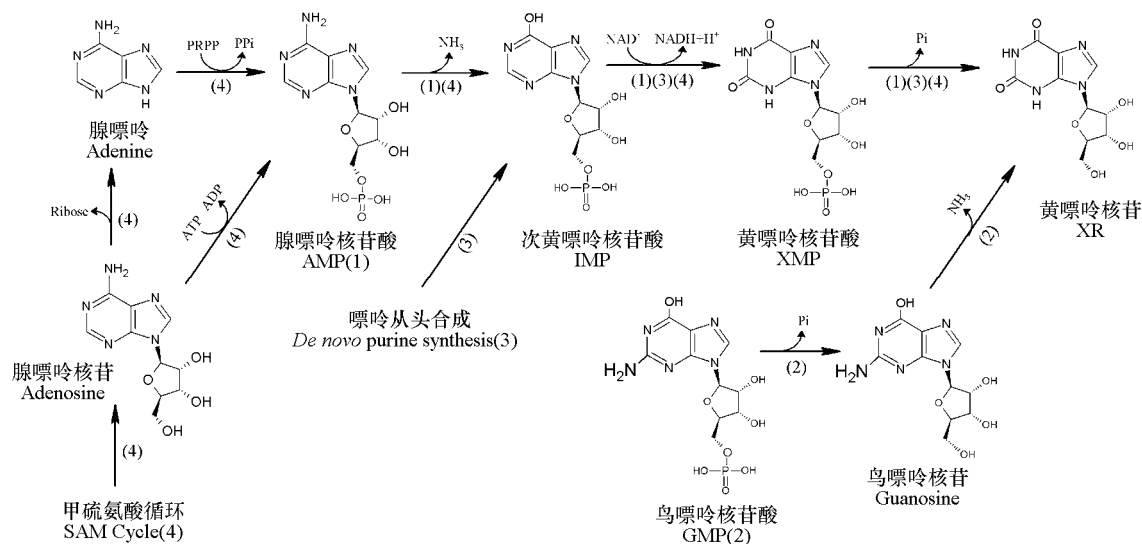


图 2 黄嘌呤核苷 (XR) 的四条合成途径 (修改自 Ashihara et al., 2008)

(1) AMP 途径; (2) GMP 途径; (3) 从头合成途径; (4) SAM 途径。

Fig. 2 Four proposed biosynthesis routes for xanthosine (Adapted from Ashihara et al., 2008)

(1) AMP route; (2) GMP route; (3) *De novo* route; (4) SAM route.

对于甲基供体的研究则相对简单。Anderson 和 Gibbs (1962) 的研究指出甲硫氨酸和其他 C_1 化合物, 如甲醛、甲酸盐等可以作为咖啡碱合成途径中的甲基供体, 且甲硫氨酸转化效率最高。鉴于甲硫氨酸腺苷(S-adenosylmethionine, SAM)是生物体内许多生化反应的直接甲基供体, Suzuki (1972) 研究表明在茶树新梢细胞中 SAM-methyl- ^{14}C 中的放射性标记可以很快转移到咖啡碱中, 从而证实了咖啡碱的生物合成仍然是以 SAM 为直接甲基供体。甲硫氨酸与 ATP 作用而生成 SAM, 释放出甲基后转化为 SAH, SAH 分解为腺苷和高半胱氨酸, 后者再参与形成甲硫氨酸, 即完成所谓的 SAM 循环 (Ashihara & Crozier, 2001)。冯艳飞和梁月荣 (2001) 从茶树中克隆得到 SAM 合成酶的基因, 序列全长 1 303 bp, 编码 394 个氨基酸。

2 酶与基因

如前所述, 咖啡碱的核心合成途径涉及到 3 次甲基化和 1 次脱核苷反应。虽然 Negishi 等 (1988) 报道过从茶树叶片中初步分离出 N-甲基核苷水解酶, 但此后关于这个酶的专题报道很少, 无论是在茶树或咖啡植物中都没能得到编码它的基因序列。因此这里将重点讨论咖啡碱核心合成途径中的 N-甲基转移酶及其编码基因, 这些酶的催化活性及基因的表达特点对植物中咖啡碱的生物合成起着重要的调控作用 (Maluf et al., 2009; Kato et al., 2010)。

2.1 N-甲基转移酶分离纯化

1975 年, 在“多酚吸附剂”聚乙烯吡咯烷 (polyclar AT) 的辅助下, 日本学者首次从茶树新梢提取出参与咖啡碱合成的初酶液, 该酶液可催化 $7mX \rightarrow Tb$ 和 $Tb \rightarrow Cf$ 两步反应, 虽然这两种催化活性对 pH 和离子浓度的变化反应较为一致, 但当时不能确定它们是否为同一个酶 (Suzuki & Takahashi, 1975)。20 世纪 90 年代中期, 学者们尝试从咖啡叶片 (Mazzafera et al., 1994) 和茶树新梢 (Kato et al., 1996) 中分离纯化咖啡碱合成相关酶, 发现这些天然酶非常不稳定, 只能部分纯化产物, 到后面的步骤其活性就消失了。

Mösli 等 (1997) 用阳离子交换色谱和色谱聚焦等方法从咖啡树叶片中分离出 N^7 -甲基转移酶, 首次将它与 N^1/N^3 -甲基转移酶区分开来。Kato 等 (1999) 使用 Adenosine-agarose 亲和色谱等方法, 从茶树新梢中分离得到高纯度的 N-甲基转移酶。在 SAM 的存在下, 该酶能够催化 7-甲基黄嘌呤转化为可可碱, 也能将可可碱甲基化合成咖啡碱, 因此将其命为茶树咖啡碱合成酶 (Caffeine Synthase, CS)。对该酶的 N 末端氨基酸序列进行测序 (20 个氨基酸残基), 所得序列与其他甲基转移酶比对, 相似性较低 (Kato et al., 1999)。值得一提的是 CS 的最佳底物为 1,7-二甲基黄嘌呤, 其催化活性是对可可碱的 2~3 倍, 但由于细胞中 1,7-二甲基黄嘌呤的合成非常有限, 所以它不是咖啡碱的主要合成前体 (Kato et al., 1999)。这与前人的研究结果相一致 (Suzuki & Takahashi, 1975; Kato et al., 1996)。

2.2 基因及其进化关系

在得到茶树咖啡碱合成酶 (CS) 的氨基酸末端序列后, Kato 等 (2000) 很快就报道了基于该段序列设计引物利用 RACE 技术克隆得到茶树编码 CS 的全长 cDNA 序列, 命名为 *TCSI* (GenBank 登录号 AB031280, 下同)。将 *TCSI* 转移到大肠杆菌中表达, 所得重组酶与从茶树新梢提取的天然酶的底物专一性高度相似, 证实了 *TCSI* 就是编码茶树咖啡碱合成酶的基因 (Kato et al., 2000)。后来茶树上又发现了与 *TCSI* 同源的 *TCS2* (AB031281), 它们之间具有 89% 的相似性, 但 *TCS2* 体外重组酶却没有 N-甲基转移酶活性 (Yoneyama et al., 2006)。

基于 *TCS1* 的序列信息, 2001 至 2003 年间日本两个独立的课题组利用探针筛选法和 RACE 等技术, 分别从咖啡植物中克隆出了一系列咖啡碱合成酶基因, 包括 7mXR 合成酶基因 *CaXMT1* (AB048793), 可可碱合成酶基因 *CaMXMT1* (AB048794)、*CaMXMT2* (AB084126)、*CTS2* (AB054841), 咖啡碱合成酶基因 *CaDXMT1* (AB084125) 和双功能酶基因 *CCS1* (AB086414) 等 (Ogawa et al., 2001; Mizuno et al., 2003a, 2003b; Uefuji et al., 2003)。虽然这些酶的氨基酸序列具有 80% 以上的相似性, 底物专一性却差异较大 (Uefuji et al., 2003)。

在茶树和咖啡植物上的研究成果简化了对其他植物嘌呤碱代谢相关基因的克隆。Yoneyama 等 (2006) 克隆得到山茶属缅甸茶 (*C. irrawadiensis*) 与可可茶 (*C. pitilophylla*) 以及可可属可可树 (*Theobroma cacao*) 中与 *TCS1* 同源的基因, 分别命名为 *ICS1* (AB056108)、*PCS1* (AB207817) 和 *BTS1* (AB096699), 重组酶试验表明它们编码的蛋白质只具有 N³ 位甲基化活性, 为可可碱合成酶。这解释了为什么这些植物中可可碱含量丰富, 而咖啡碱含量却很低。随后又有研究证实存在其他 5 份没有嘌呤碱代谢的山茶属植物 (*C. granthamiana*, *C. lutchuensis*, *C. kissi*, *C. japonica* 和 *C. chrysantha*) 的基因组中同样存在与 *TCS1* 同源的基因 (氨基酸序列相似性都在 90% 左右), 且重组酶试验证明它们编码的蛋白质也具有可可碱合成酶活性 (Ishida et al., 2009)。在咖啡碱含量很高 (种子中可达干质量的 2.7% ~ 5.8%) 的瓜拿纳泡林藤的果实转录组中, 也检测到大量与 *TCS1* 和 *TCS2* 同源的 DNA 序列 (如 EC777580 和 EC778137 等), 相似性达 43% ~ 62% (Figueirêdo et al., 2011), 但还有待进一步研究。

将参与咖啡碱合成的相关基因翻译成氨基酸序列, 利用 ClustalW 程序进行比对, 同时也与其他甲基转移酶比较, 结果如图 3 所示: (1) 来源于同一属的基因聚在了一起, 而没有按照功能来区分, 这表明不同种属间咖啡碱合成酶基因是平行进化关系 (Parallel evolution), 即独立进

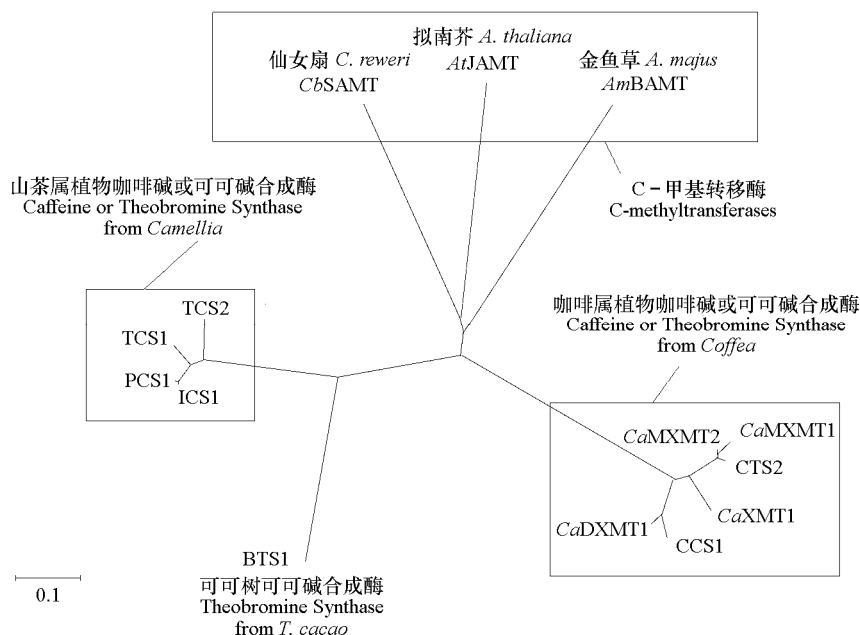


图 3 咖啡碱及相关合成酶的系统发育关系

Fig. 3 Phylogenetic relationship of caffeine synthases and its related enzymes

序列来源 The sources of the sequences are as follows: *TCS1* (AB031280), *TCS2* (AB031281), *PCS1* (AB207817), *ICS1* (AB056108), *CbSAMT* (AF133053), *AtJAMT* (AY008434), *AmBAMT* (AF198492), *CaMXMT1* (AB048794), *CaMXMT2* (AB084126), *CTS2* (AB054841), *CaXMT1* (AB048793), *CCS1* (AB086414), *CaDXMT1* (AB084125), *BTS1* (AB096699) .

化出相似的性状 (Ogawa et al., 2001; Yoneyama et al., 2006); (2) 相对于其他 N - 甲基转移酶, 咖啡碱及相关合成酶与水杨酸甲基转移酶 (*CbSAMT*, AF133053)、茉莉酮酸甲基转移酶 (*AtJAMT*, AY008434) 和苯甲酸甲基转移酶 (*AmBAMT*, AF198492) 等 C - 甲基转移酶表现出较高的相似性 (大约为 40%)。

2.3 酶的分子结构

参与咖啡碱合成的 N - 甲基转移酶由 360 ~ 385 个氨基酸残基组成, 来自同一属的不同功能的酶的氨基酸序列往往具有很高的相似性 (Uefuji et al., 2003), 这表明这些酶的底物识别可能只取决于少数关键的氨基酸残基。在比较了 *CaMXMT1* 和 *CaMTLs* (与 *CaMXMT1* 高度相似但没有活性) 的氨基酸序列后, Ogawa 等指出 *CaMXMT1* 中的 Val¹⁵⁹-His¹⁶⁰-Tyr¹⁶¹ (VHW) 结构可能对酶活性具有重要影响 (Ogawa et al., 2001)。Yoneyama 等 (2006) 利用杂交酶和定点突变技术来研究这些酶的底物识别位点, 将可可碱合成酶 *PCS1* 基因中间含有 173 个氨基酸残基的片段用 *TCS1* 中对应序列替换后, 可使其具有咖啡碱合成酶活性。进一步对 *PCS1* 的这个片段进行点突变, 结果表明将 221 位的组氨酸替换为精氨酸后, 可引起该酶底物的专一性发生较大变化 (Yoneyama et al., 2006)。但在咖啡植物的 N - 甲基转移酶中没有对应的位点, 表明它们具有不同的底物识别机制。

植物中 SAM - 甲基转移酶一般有 A、B 和 C 3 个保守域, 它们被认为是 SAM 的结合位点 (Joshi & Chiang, 1998)。但后来研究发现许多催化小分子化合物甲基化的甲基转移酶没有 B 域, 而拥有其他两个保守域 (B' 和 YFFF), Mizuno 等 (2003a) 将这一类酶归为 B' - 甲基转移酶家族。目前已克隆得到的参与咖啡碱或可可碱合成的甲基转移酶以及前面提到的 *SAMT*、*BAMT* 和 *JAMT* 都属于这个家族 (Kato & Mizano, 2004; Yoneyama et al., 2006; Ishida et al., 2009)。研究表明这些酶在细胞中是以二聚体的形式存在 (Zubieta et al., 2003)。进一步研究发现 *CaXMT1*、*CaMXMT1* 和 *CaDXMT13* 个酶在细胞中既可形成同源二聚体, 也可形成异源二聚体, 且检测发现异源二聚体酶具有双重活性, 推测这可能有利于咖啡碱的快速合成 (Kodama et al., 2008)。

2007 年法国学者克隆得到中果咖啡 (*Coffea canephora*) 的 N - 甲基转移酶 *CcXMT1* 和 *CcDXMT1* 基因, 然后在大肠杆菌中表达并纯化结晶, 通过 X 射线衍射等分析得到其三维结构 (McCarthy et al., 2007; McCarthy & McCarthy, 2007)。其总体结构与水杨酸甲基转移酶 *SAMT* 较为相似 (Zubieta et al., 2003), 也是以二聚体的形式存在, 具有两个域: 甲基转移酶功能域和 α 螺旋帽域。同时他们还研究指出了甲基供体 SAM/SAH 以及底物 Tb/XR 的结合位点和几个关键氨基酸残基: (1) *XMT* 中的第 316 位的丝氨酸对 XR 的识别起着重要作用; (2) 在 *DXMT* 中第 266 位的苯丙氨酸置换为异亮氨酸对底物专一性识别有较大影响; (3) *DXMT* 中第 160 为组氨酸可与 Tb 中 2 位上的氧原子形成氢键, 使 N¹ 和 N³ 位的电负性增强而更易甲基化 (McCarthy & McCarthy, 2007)。这与前人的研究结果 (Ogawa et al., 2001) 相印证。

3 转基因作物

3.1 低咖啡碱饮料作物培育

咖啡碱作为一种兴奋剂, 为茶叶、咖啡等非酒精饮料长期而广泛地流行发挥了不可替代的作用, 但现代研究证明其负面效应也不可忽视 (吴命燕 等, 2010)。因此低咖啡碱茶树和咖啡树育种是现代作物育种的一个重要课题。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术可以专一地抑制某基因表达 (Fire et al., 1998)。在

克隆得到咖啡树编码 N-甲基转移酶的基因后, 日本学者很快就报道了利用 RNAi 干扰技术成功地抑制了转基因胚胎细胞和植株幼苗中相关基因的表达, 并降低了其可可碱和咖啡碱的含量 (Ogita et al., 2003)。他们以 *CaMXMT1* 基因的 3'端非编码区序列构建了一长一短两组双链 RNAi 结构, 利用 pBIH1-IG 载体和农杆菌转导体系将其成功转入 *C. arabica* 和 *C. canephara* 两种咖啡植物的胚胎组织中, 通过再生进一步得到 *C. canephara* 的转基因植株。RT-PCR 检测发现转基因胚胎或植株中的 *CaMXMT1* 基因的 mRNA 含量明显降低, 并且 *CaXMT1* 和 *CaDXMT1* 的表达也都不同程度地被抑制, 相应地其可可碱和咖啡碱含量减少到只有对照的 30%~50% (Ogita et al., 2004)。

由于茶树细胞中多酚含量较高, 缺乏高效的转化及再生体系, 最近才报道了以基因枪转化法培育出 CS 基因沉默的转基因茶树植株 (Mohanpuria et al., 2011a)。他们以长度为 376 bp 的 CS 基因片段构建了 RNAi 结构, 以 pFGC1008-CS 为载体, 通过鸟枪法将其导入由子叶诱导的茶树体细胞胚中。在转基因胚胎细胞和再生植株中, CS 表达受到显著抑制, 而咖啡碱和可可碱的含量分别比对照下降 44%~61%和 46%~67%。另外, 他们还报道了用携带 pFGC1008-CS 的农杆菌侵染茶树幼苗根部伸长区, 成功地将 RNAi 片段导入到茶树幼苗嫩根基因组中。目标 RNAi 在根部表达, 且干扰信号被转移到叶片中。取地上部新梢检测发现 CS 表达量、咖啡碱和可可碱含量均有大幅下降 (Mohanpuria et al., 2011b)。

3.2 其他植物转化

鉴于咖啡碱在植物保护方面的功能 (Hollingsworth et al., 2002), 通过转基因手段将其应用于其他作物的病虫害防治, 也是一个重要的发展方向。2005 年, Uefuji 等报道了将咖啡碱合成途径中的 3 个甲基转移酶基因 (*CaXMT1*、*CaMXMT1* 和 *CaDXMT1*) 利用农杆菌叶盘转化法同时导入烟草 (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) 中, 得到的转基因烟草植株中检测到了咖啡碱的合成, 其在叶片中含量随着植株的发育成熟而提高, 最高达 $5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜质量 (Uefuji et al., 2005)。用转基因烟草叶片和不含咖啡碱的对照一起喂食烟草毛虫 (*Spodoptera litura*), 结果表明烟草毛虫对含有咖啡碱的叶片表现出明显的趋避性 (Uefuji et al., 2005; Kim et al., 2006)。同时研究还发现咖啡碱在转基因烟草植株中可能作为一种化学信号激活其防御系统, 从而提高植株对一些病原体如烟草花叶病毒和假单胞菌属致病菌 (*Pseudomonas syringae*) 的抗性 (Kim & Sano, 2007)。而类似地将茶树咖啡碱合成酶 *TCS1* 基因也导入到烟草植株中, 虽然检测到 *TCS1* 的表达且其表达产物具有可可碱和咖啡碱合成酶活性, 但在转基因烟草植株中未检测到咖啡碱合成, 可能是由于缺乏底物 7mX (余有本等, 2007)。

最近 Kim 等利用上述类似的方法又培育出了能合成咖啡碱的菊花植株 (*Chrysanthemum morifolium*), 试验表明含有咖啡碱 ($3 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) 的菊花叶片对甜菜粘虫 (*Spodoptera exigua*) 和棉蚜 (*Aphis gossypii*) 表现出较强的抗性 (Kim et al., 2011a)。同时也发现转基因菊花的叶片中水杨酸含量大幅提高, 对一些真菌病原的抗性也得到增强 (Kim et al., 2011b)。

4 总结与展望

人类对咖啡碱的利用已有数千年的历史, 18 世纪 20 年代将其从咖啡植物中分离出来, 随后对其结构、药理学特性以及其生物分布、代谢特点进行了长期的研究 (Ashihara & Crozier, 2001)。20 世纪 60 至 80 年代主要是对咖啡碱的合成途径及其供体来源进行研究, 90 年代相对集中于对相关酶的分离纯化, 21 世纪初的研究则包括酶的基因克隆、酶的结构分析以及相关转基因作物培育等。

未来该领域的研究应从以下几个方面进一步完善: (1) 尚未得到的酶与基因的分离和克隆, 如 7mXR 核苷水解酶和茶树中 N⁷-甲基转移酶等。另外由于茶树与咖啡树之间差异较大, 有必要对茶树咖啡碱合成酶 CS 的精细结构进行研究, 以进一步揭示这些酶的异同之处和关键位点。(2) 加强表达调控机制研究, 目前对于相关基因表达特点和酶活性调节机制的研究已有报道, 但其内在调控机制还处于未知状态, 要解决此类问题需要新的研究手段和方法。(3) 转基因技术等相关应用有待进一步开发, 同时需要对其稳定性、安全性以及经济价值做出评价。

References

- Anderson L, Gibbs M. 1962. The biosynthesis of caffeine in the coffee plant. *J Biol Chem*, 237 (6): 1941 – 1944.
- Ashihara H, Crozier A. 1999. Biosynthesis and catabolism of caffeine in low-caffeine-containing species of *Coffea*. *J Agr Food Chem*, 47: 3425 – 3431.
- Ashihara H, Crozier A. 2001. Caffeine: A well known but little mentioned compound in plant science. *Trends Plant Sci*, 6 (9): 407 – 413.
- Ashihara H, Kato M, Ye C X. 1998. Biosynthesis and metabolism of purine alkaloids in leaves of cocoa tea (*Camellia ptilophylla*). *J Plant Res*, 111: 599 – 604.
- Ashihara H, Monteiro A M, Gillies F M, Crozier A. 1996. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiol*, 111: 747 – 753.
- Ashihara H, Sano H, Crozier A. 2008. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*, 69: 841 – 856.
- Ashihara H. 1993. Purine metabolism and the biosynthesis of caffeine in maté leaves. *Phytochemistry*, 33 (6): 1427 – 1430.
- Baumann T W, Looser E D, Wanner H. 1978. 7-methylxanthosine—An intermediate in caffeine biosynthesis. *Phytochemistry*, 17 (12): 2075 – 2076.
- Feng Yan-fei, Liang Yue-rong. 2001. Cloning and sequencing of S-adenosylmethionine synthetase gene in tea plant. *Journal of Tea Science*, 21 (1): 21 – 25. (in Chinese)
- 冯艳飞, 梁月荣. 2001. 茶树 S-腺苷甲硫氨酸合成酶基因的克隆和序列分析. *茶叶科学*, 21 (1): 21 – 25.
- Figueirêdo L C, Faria-Campos A C, Astolfi-Filho S, Azevedo J L. 2011. Identification and isolation of full-length cDNA sequences by sequencing and analysis of expressed sequence tags from guarana (*Paullinia cupana*). *Genet Mol Res*, 10 (2): 1188 – 1199.
- Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806 – 811.
- Hollingsworth R G, Armstrong J W, Campbell E. 2002. Caffeine as a repellent for slugs snail: At high concentrations this stimulant becomes a lethal neurotoxin to garden pests. *Nature*, 417: 915 – 916.
- Ishida M, Kitao N, Mizuno K, Tanikawa N, Kato M. 2009. Occurrence of theobromine synthase genes in purine alkaloid-free species of *Camellia* plants. *Planta*, 229: 559 – 568.
- Ito E, Ashihara H. 1999. Contribution of purine nucleotide biosynthesis de novo to the formation of caffeine in young tea (*Camellia sinensis*) leaves. *Plant Physiol*, 254: 145 – 151.
- Joshi C P, Chiang V L. 1998. Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol Biol*, 37: 663 – 674.
- Kato M, Kanehara T, Shimizu H, Suzuki T, Gillies F M, Crozier A, Ashihara H. 1996. Caffeine biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*: *in vitro* studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine. *Physiol Plantarum*, 98: 629 – 636.
- Kato M, Kitao N, Ishida M, Morimoto H, Irino F. 2010. Expression for caffeine biosynthesis and related enzymes in *Camellia sinensis*. *Z Naturforsch C*, 65: 245 – 256.
- Kato M, Mizuno K, Crozier A, Fujimura T, Ashihara H. 2000. Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature*, 406: 956 – 957.
- Kato M, Mizuno K, Fujimura T, Crozier A, Ashihara H. 1999. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves. *Plant Physiol*, 120: 579 – 586.
- Kato M, Mizuno K. 2004. Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Front Biosci*, 9: 1833 – 1842.
- Keya C A, Crozier A, Ashihara H. 2003. Inhibition of caffeine biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) plants by ribavirin.

- FEBS Lett, 554: 473 – 477.
- Kim Y S, Lim S, Kang K K, Jung Y J, Lee H Y, Choi Y E, Sano H. 2011a. Resistance against beet armyworms and cotton aphids in caffeine-producing transgenic chrysanthemum. *Plant Biotechnol*, 28: 393 – 395.
- Kim Y S, Lim S, Yoda H, Choi C S, Choi Y E, Sano H. 2011b. Simultaneous activation of salicylate production and fungal resistance in transgenic chrysanthemum producing caffeine. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (3): 409 – 412
- Kim Y S, Sano H. 2007. Pathogen resistance of transgenic tobacco plants producing caffeine. *Phytochemistry*, 69: 882 – 888.
- Kim Y S, Uefuji H, Ogita S, Sano H. 2006. Transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control. *Transgenic Res*, 15: 667 – 672.
- Kodama Y, Shinya T, Sano H. 2008. Dimerization of N-methyltransferases involved in caffeine biosynthesis. *Biochimie*, 90: 547 – 551.
- Koshiishi C, Kato A, Yama S, Crozier A, Ashihara H. 2001. A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: Utilization of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS Lett*, 499: 50 – 54.
- Koyama Y, Tomoda Y, Kato M, Ashihara H. 2003. Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiol Biochem*, 41 (11/12): 977 – 964.
- Maluf M P, Silva C C, Oliveira M P A, Tavares A G, Silvarolla M B, Filho O G. 2009. Altered expression of the caffeine synthase gene in a naturally caffeine-free mutant of *Coffea arabica*. *Genet Mol Biol*, 32 (4): 802 – 810.
- Mazzafera P, Wingsle G, Olesson O, Sandberg G. 1994. S-adenosyl-L-methionine: Theobromine 1-N-methyltransferase, an enzyme catalyzing the synthesis of caffeine in coffee. *Phytochemistry*, 37 (6): 1577 – 1584.
- McCarthy A A, Biget L, Lin C W, Petiard V, Tanksley S D, McCarthy J G. 2007. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of the XMT and DXMT N-methyltransferases from *Coffea canephora* (robusta). *Acta Cryst*, 63 (4): 304 – 307.
- McCarthy A A, McCarthy J G. 2007. The structure of two N-methyltransferases from the caffeine biosynthetic pathway. *Plant Physiol*, 144: 879 – 889.
- Mizuno K, Kato M, Irino F, Yoneyama N, Fujimura T, Ashihara H. 2003a. 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 (1 – 3): 56 – 60.
- Mizuno K, Okuda A, Kato M, Yoneyama N, Tanaka H, Ashihara H, Fujimura T. 2003b. Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Lett*, 534 (1 – 3): 75 – 81.
- Mohanpuria P, Kumar V, Ahuja P S, Yadav S K. 2011a. Producing low-caffeine tea through post-transcriptional silencing of caffeine synthase mRNA. *Plant Mol Biol*, 76: 523 – 534.
- Mohanpuria P, Kumar V, Ahuja P S, Yadav S K. 2011b. *Agrobacterium*-mediated silencing of caffeine synthesis through root transformation in *Camellia sinensis* L. *Mol Biotechnol*, 48: 235 – 243.
- Möslé Waldhauser S S, Gillies F M, Crozier A, Baumann T W. 1997. Separation of the N-7 methyltransferase, the key enzyme in caffeine biosynthesis. *Phytochemistry*, 45 (7): 1407 – 1414.
- Nazario G M, Lovatt C J. 1993. Separate *de novo* and salvage purine pools are involved in the biosynthesis of theobromine but not caffeine in leaves of *coffea arabica* L. *Plant Physiol*, 103: 1203 – 1210.
- Negishi O, Ozawa T, Imagawa H. 1994. Guanosine deaminase and guanine deaminase from tea leaves. *Biosci Biotech Biochem*, 58: 1277 – 1281.
- Negishi O, Ozawa T, Imagawa H. 1985. Conversion of xanthosine into caffeine in tea plants. *Agric Biol Chem*, 49 (1): 251 – 253.
- Negishi O, Ozawa T, Imagawa H. 1988. N-methyl nucleosidase from tea leaves. *Agric Biol Chem*, 52 (1): 169 – 175.
- Negishi O, Ozawa T, Imagawa H. 1992. Biosynthesis of caffeine from purine nucleotides in tea plant. *Biosci Biotech Biochem*, 56 (3): 499 – 503.
- Ogawa M, Herai Y, Koizumi N, Kusano T, Sano H. 2001. 7-methylxanthine methyltransferase of coffee plants. *J Biol Chem*, 276 (11): 8213 – 8218.
- Ogita S, Uefuji H, Morimoto M, Sano H. 2004. Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol*, 54: 931 – 941.
- Ogita S, Uefuji H, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H. 2003. Producing decaffeinated coffee plants. *Nature*, 423: 823.

- Ogutuga D B A, Northcote D H. 1970. Biosynthesis of caffeine in tea callus tissue. *Biochem J*, 117: 715 – 720.
- Schulthess B H, Morath P, Baumann T W. 1996. Caffeine biosynthesis starts with the metabolically channeled formation of 7-methyl-XMP—A new hypothesis. *Phytochemistry*, 41 (1): 169 – 175.
- Stasolla C, Katahira R, Thorpe T A, Ashihara H. 2003. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *J Plant Physiol*, 160: 1271 – 1295.
- Suzuki T, Ashihara H, Waller G R. 1992. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. *Phytochemistry*, 31 (8): 2575 – 2584.
- Suzuki T, Takahashi E. 1975. Biosynthesis of caffeine by tea-leaf extracts: enzymic formation of theobromine from 7-methylxanthine and of caffeine from theobromine. *Biochem J*, 146: 87 – 96.
- Suzuki T. 1972. The participation of S-adenosylmethionine in the biosynthesis of caffeine in tea plant. *FEES Letters*, 24: 18 – 20.
- Suzuki T. 1973. Metabolism of methylamine in the tea plant (*Thea sinensis* L.). *Biochem J*, 132: 753 – 763.
- Uefuji H, Ogita S, Yamaguchi Y, Koizumi N, 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.
- Uefuji H, Tatsumi Y, Morimoto M, Kaathien-Nakayama P, Ogita S, Sano H. 2005. Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant Mol Biol*, 59: 221 – 227.
- Waller G R, MacVean C D, Suzuki T. 1983. High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Cell Rep*, 2: 109 – 112.
- Wu Ming-yan, Fan Fang-yuan, Liang Yue-rong, Zheng Xin-qiang, Lu Jian-liang. 2010. The physiological functions of caffeine and their related mechanisms. *Journal of Tea Science*, 30 (4): 235 – 242. (in Chinese)
- 吴命燕, 范方媛, 梁月荣, 郑新强, 陆建良. 2010. 咖啡碱的生理功能及其作用机制. *茶叶科学*, 30 (4): 235 – 242.
- Yoneyama N, Morimoto H, Ye C X, Ashihara H, Mizuno K, 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 Genomics*, 275: 125 – 135.
- Yu You-ben, Jiang Chang-jun, Wan Xiao-chun, Li Xing-hui. 2007. Expression of tea caffeine synthase cDNA in tobacco. *Journal of Northwest A & F University: Nat Sci Ed*, 35 (11): 181 – 186. (in Chinese)
- 余有本, 江昌俊, 宛晓春, 黎星辉. 2007. 茶树咖啡碱合成酶基因 cDNA 在烟草中的表达. *西北农林大学学报: 自然科学版*, 35 (11): 181 – 186.
- Zhou Chen-yang, Jin Ji-qiang, Yao Ming-zhe, Chen Liang. 2011. Progress on purine alkaloids metabolism in tea and other plants. *Journal of Tea Science*, 31 (2): 87 – 94. (in Chinese)
- 周晨阳, 金基强, 姚明哲, 陈 亮. 2011. 茶树等植物中嘌呤生物碱代谢研究进展. *茶叶科学*, 31 (2): 87 – 94.
- Zubieta C, Ross J R, Koscheshi P, Yang Y, Pichershy E, Noel J P. 2003. Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell*, 15: 1704 – 1716.