

茶树苦茶碱合成酶CkTcS的结构分析

Structure analysis of theacrine
synthase CkTcS in tea

2021年5月11日

报告人：璩馥榕
中国农业科学院研究生院
2021级硕士4班

小组成员

编号	姓名	研究所	导师	研究方向
4G02A	璩馥榕	茶叶所	金基强	茶树种质资源创新
4G02B	王倩	茶叶所	付建玉	茶树抗性基因发掘利用
4G02C	王月琪	茶叶所	曾建明	茶树育种
4G02D	荀涵硕	茶叶所	韦康	茶树遗传育种

主要内容

1

研究背景介绍

2

苦茶碱合成酶CkTcS结构分析

背景介绍

- 嘌呤生物碱(purinealkaloids)是一类具有相同嘌呤环的天然生物碱类物质，在特定的环境下可发生结构的相互转化。主要包括咖啡碱(caffeine)、茶叶碱(theophylline)、可可碱(theobromine)、黄嘌呤(xanthine)、次黄嘌呤(hypoxanthine)、拟黄嘌呤(paraxanthine)和甲基尿酸(methyluricacid)等。
- 茶树 (Camellia sinensis) 中主要的嘌呤生物碱有咖啡碱 (1, 3, 7-三甲基黄嘌呤)、可可碱 (3, 7-二甲基黄嘌呤)、茶叶碱 (1, 3-二甲基黄嘌呤)。

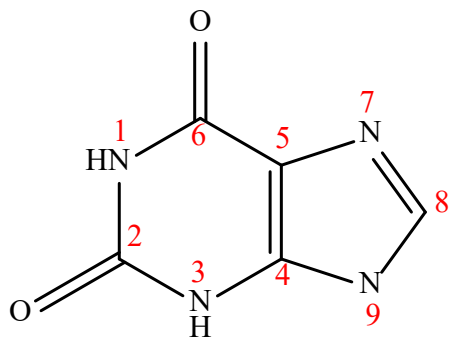
背景介绍

- 1984年张宏达教授发表了一种茶的新变种，即苦茶*C.sinensis* var.*kucha kucha*(Chang et Wang)Chang，它是我国特有的野生大叶种茶树，生长于云南东南部的高山。1998年，张宏达等又将其组合成*C.assamica* var. *kucha*Chang et Wang，作为阿萨姆茶的变种。石祥刚等根据其外形特征及内含成分将其从变种提升为种*C.kucha*Chang et Wang。苦茶中主要的嘌呤生物碱为苦茶碱1, 3, 7, 9-四甲基尿酸(theacrine, TC)，占干重的1.3%-3.4%。研究表明它具有良好的抗抑郁、镇静催眠、抗炎镇痛、减轻肝细胞的应激性损伤等药理作用。除苦茶外，秃房茶 (*Camellia gymnogyna* Chang) 中也含有苦茶碱，但苦茶碱并不是秃房茶最主要的嘌呤生物碱。同位素示踪实验证明，苦茶叶片中的苦茶碱是由咖啡碱经1, 3, 7-三甲基尿酸作为中间体合成。

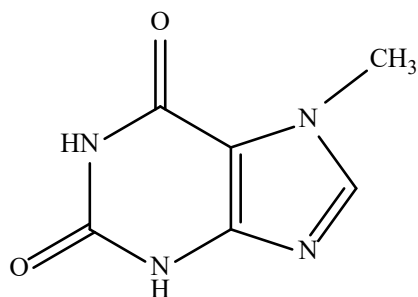
背景介绍

- 从苦茶中克隆出了三种N-甲基转移酶，分别命名为CkCS、CkTbS和CkTcS，酶动力学分析表明CkCS和CkTbS分别表现出显著的N1、N3和N3甲基转移酶活性。CkTcS表现出N9甲基转移酶活性，它以1, 3, 7-三甲基尿酸为底物，将其转化为苦茶碱（1, 3, 7, 9-四甲基尿酸）。
- 由于摄入咖啡碱可能会导致血压升高、心脏病、焦虑等副作用，而苦茶碱是由咖啡碱经1, 3, 7-三甲基尿酸作为中间体合成，开展苦茶碱合成酶的研究可能会为未来开发低咖啡碱饮料提供指导。

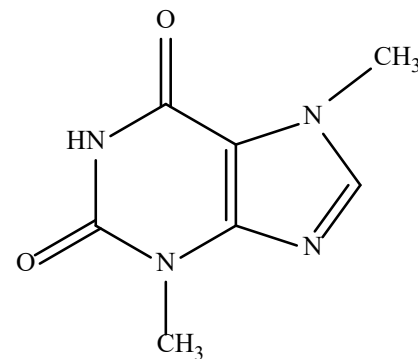
合成过程流程图



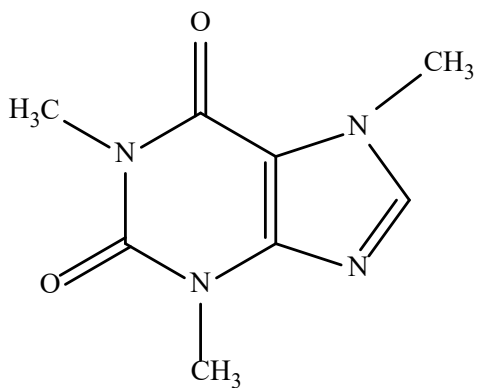
黄嘌呤



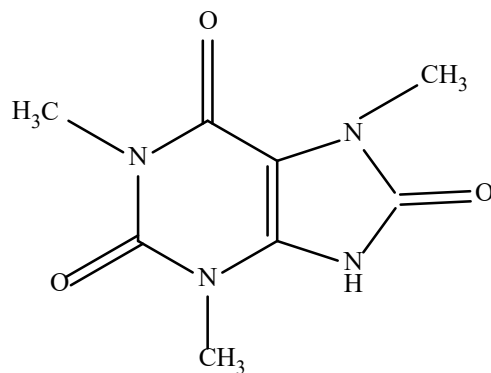
7-甲基黄嘌呤



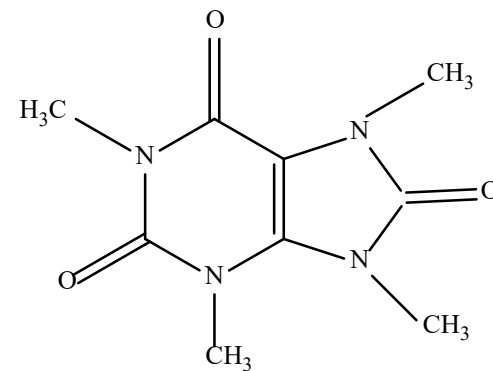
3, 7-二甲基黄嘌呤



1, 3, 7-三甲基黄嘌呤



1, 3, 7-三甲基尿酸



1, 3, 7, 9-四甲基尿酸

苦茶碱合成酶CkTcS一级结构分析

——用ProtParam分析蛋白质基本理化性质

Number of amino acids: 370

Molecular weight: 41605.80

Theoretical pI: 5.47

Amino acid composition:

CSV format

Ala (A)	20	5.4%
Arg (R)	14	3.8%
Asn (N)	17	4.6%
Asp (D)	18	4.9%
Cys (C)	8	2.2%
Gln (Q)	13	3.5%
Glu (E)	29	7.8%
Gly (G)	22	5.9%
His (H)	9	2.4%
Ile (I)	22	5.9%
Leu (L)	36	9.7%
Lys (K)	23	6.2%
Met (M)	14	3.8%
Phe (F)	23	6.2%
Pro (P)	13	3.5%
Ser (S)	32	8.6%
Thr (T)	19	5.1%
Trp (W)	3	0.8%
Tyr (Y)	8	2.2%
Val (V)	27	7.3%
Pyl (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 47

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 37

Atomic composition:

Carbon	C	1856
Hydrogen	H	2914
Nitrogen	N	486
Oxygen	O	554
Sulfur	S	22

Formula: C₁₈₅₆H₂₉₁₄N₄₈₆O₅₅₄S₂₂

Total number of atoms: 5832

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 34.58

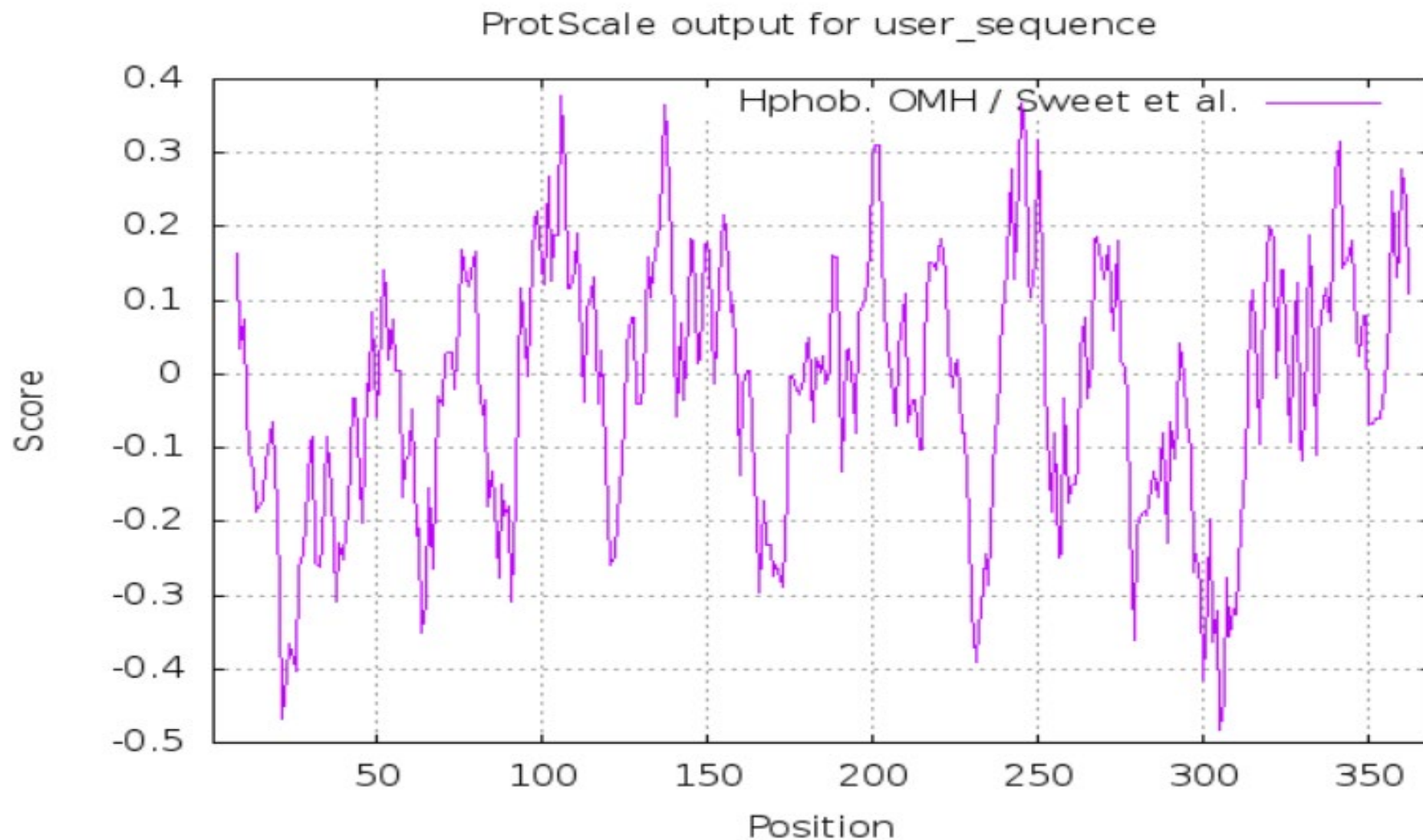
This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 87.70

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.098

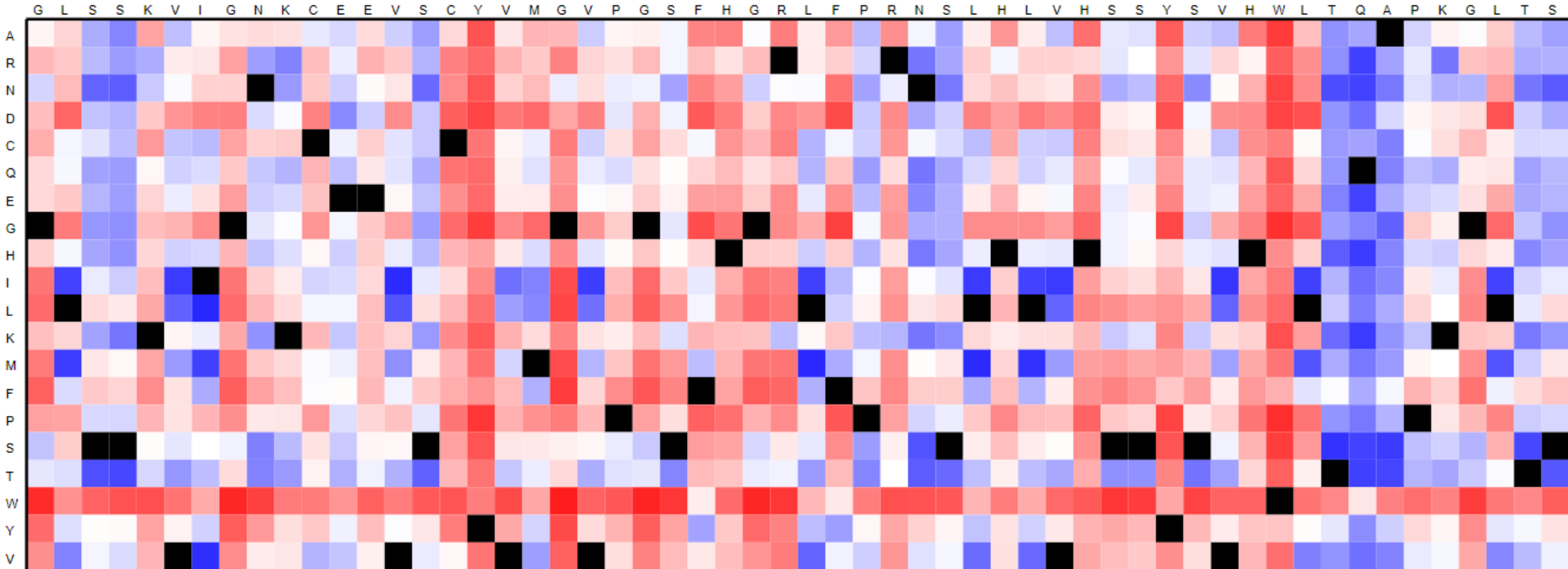
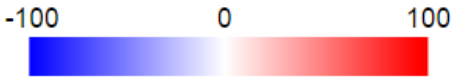
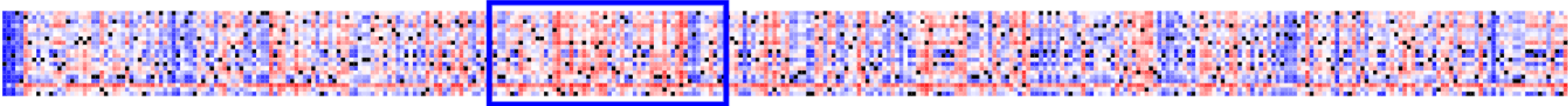
苦茶碱合成酶CkTcS一级结构分析

——用ProtScale查找亲疏水特性



苦茶碱合成酶CkTcS一级结构分析

——用PredictProtein预测蛋白的突变位点敏感性

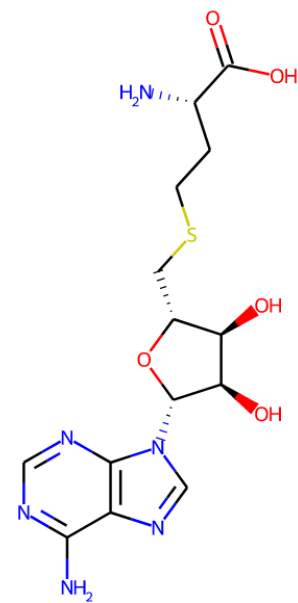
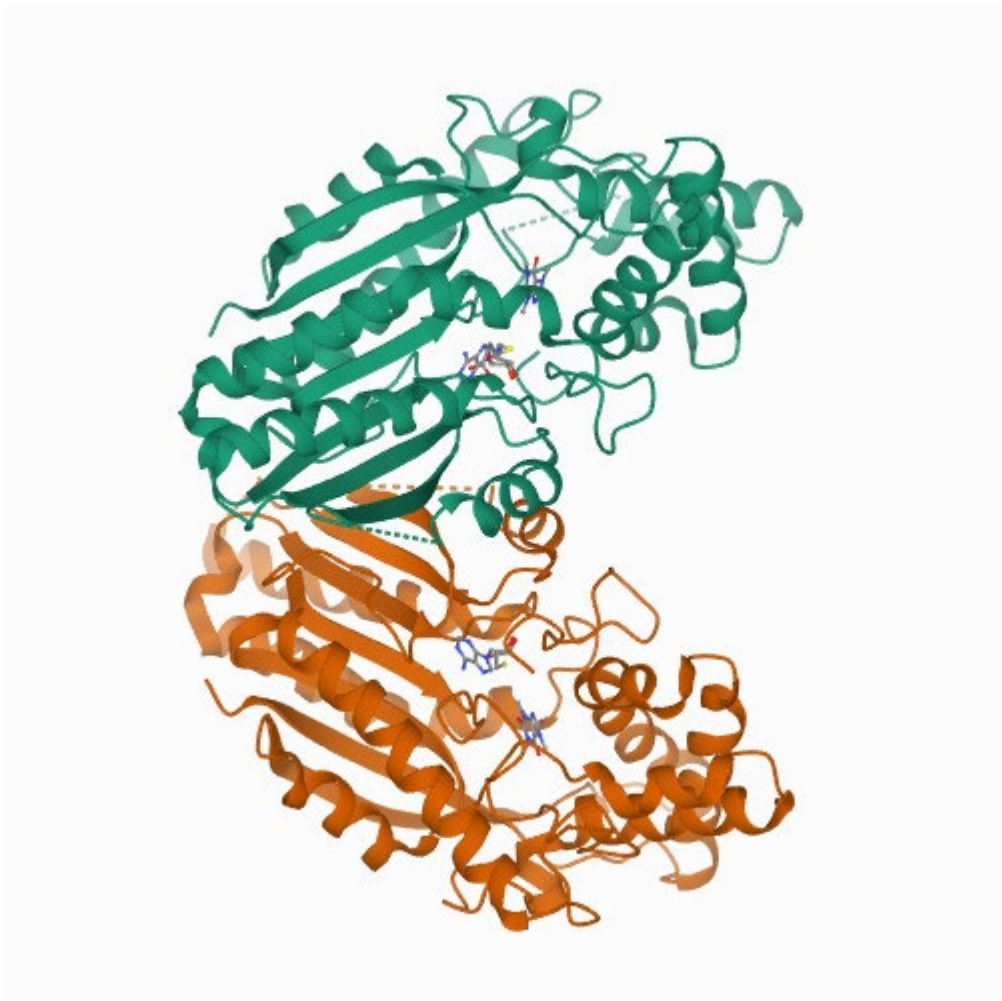


用PredictProtein预测亚细胞定位

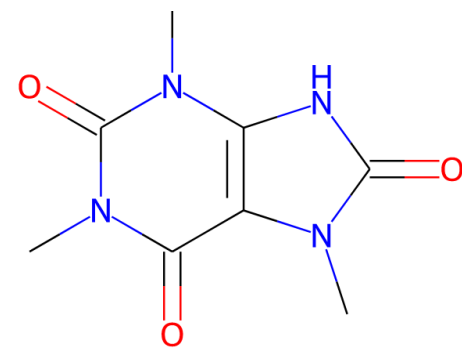


Predicted localization for the Eukarya domain: Cytoplasm (GO term ID: [GO:0005737](#)) Prediction confidence 27

苦茶碱合成酶CkTcS的三级结构 (PDB登录号: 6LYH)



SAH



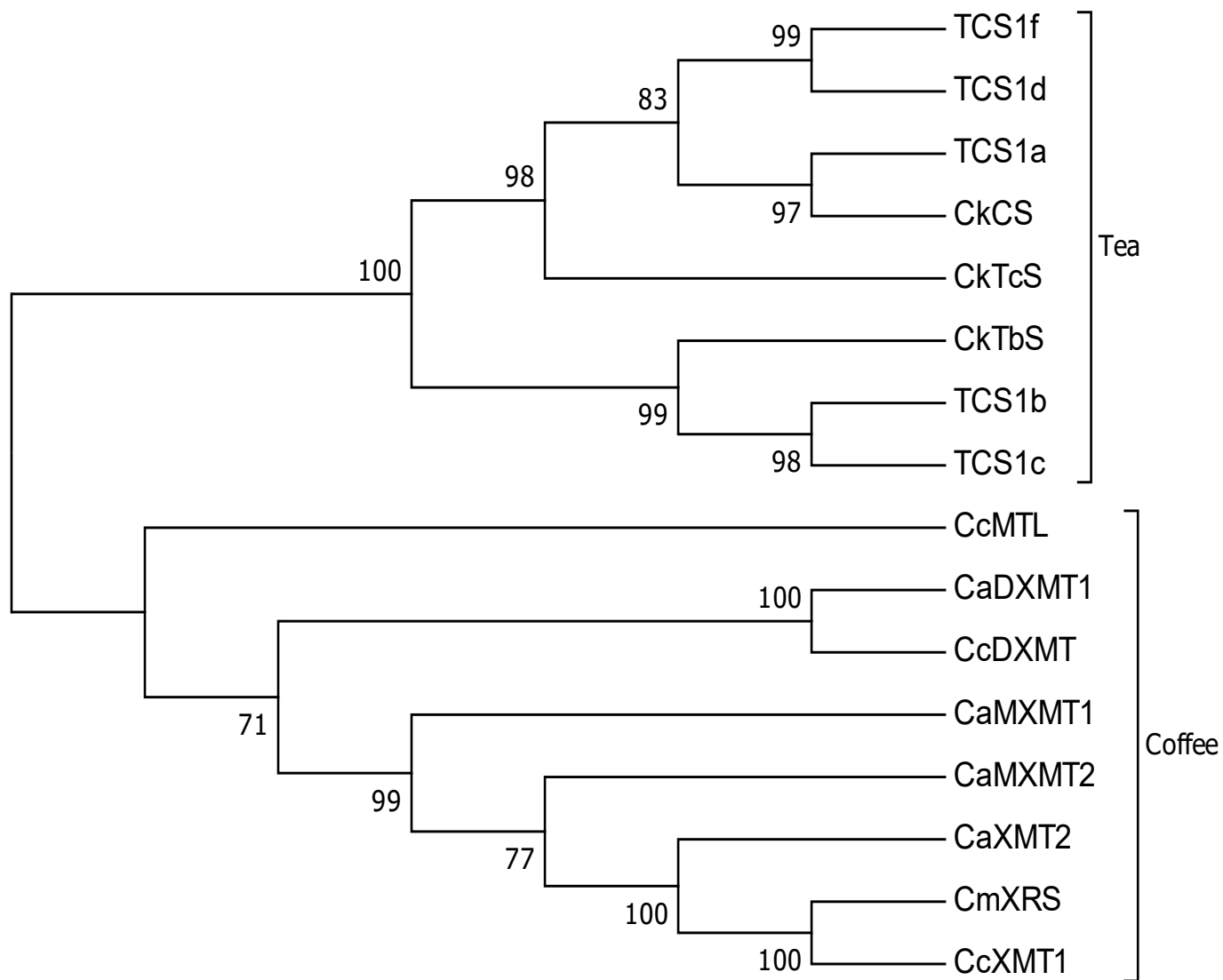
1, 3, 7-三甲基尿酸

- 从苦茶中克隆出了三种N-甲基转移酶，分别命名为CkCS、CkTbS和CkTcS，酶动力学分析表明CkCS和CkTbS分别表现出显著的N1、N3和N3甲基转移酶活性。CkTcS表现出N9甲基转移酶活性，它以1, 3, 7-三甲基尿酸为底物，将其转化为苦茶碱（1, 3, 7, 9-四甲基尿酸）。
- 利用CKTCS_CAMSB蛋白序列做BLAST，在BLASTP中搜索SWISSPROT库，得到69个结果，从其中挑选来自茶树及野生茶树、小果咖啡（*Coffea arabica*）、中粒种咖啡（*Coffea canephora*）的N-甲基转移酶，如下表

蛋白信息表

编号	蛋白名	物种名	登录号	作用位点
TCS1f	Caffeine synthase 1 TCS1f	Camellia crassicolumna	A0A0S2PM92.1	N1、N3
TCS1b	7-methylxanthine methyltransferase ICS1	Camellia irrawadiensis	Q2HXL9.1	N3
TCS1c	7-methylxanthine methyltransferase PCS1	Camellia ptilophylla	Q2HXI6.1	N3
TCS1a	3,7-dimethylxanthine N-methyltransferase TCS1	Camellia sinensis	Q9FZN8.1	N1、N3
CkTcS	1,3,7-trimethyluric acid N-methyltransferase CkTcS	Camellia sinensis var. assamica	A0A6C0WW36.1	N9
CkTbS	3,7-dimethylxanthine N-methyltransferase CkTbS	Camellia sinensis var. assamica	A0A6C0WX00.1	N3
CkCS	3,7-dimethylxanthine N-methyltransferase TCS1 CkCS	Camellia sinensis var. assamica	A0A6C0WW38.1	N1、N3
TCS1d	Caffeine synthase 1 TCS1d	Camellia taliensis	A0A0S2PMA8.1	N1、N3
CmXRS	7-methylxanthosine synthase 1 CmXRS1	Coffea arabica	Q9AVK0.1	N7
CaDXMT1	3,7-dimethylxanthine N-methyltransferase CaDXMT1	Coffea arabica	Q8H0D2.1	N1、N3
CaXMT2	Xanthosine methyltransferase 2 CaXMT2	Coffea arabica	A0A096VHY7.1	N7
CaMXMT1	Monomethylxanthine methyltransferase 1 CaMXMT1	Coffea arabica	Q9AVJ9.1	N3
CcMTL	Probable caffeine synthase MTL	Coffea canephora	A0A096VHZ1.1	N1
CcXMT1	7-methylxanthosine synthase 1 CcXMT1	Coffea canephora	A4GE69.2	N3
CaMXMT2	Monomethylxanthine methyltransferase 2 CaMXMT2	Coffea canephora	Q8RVM0.1	N3
CcDXMT	3,7-dimethylxanthine N-methyltransferase CcDXMT	Coffea canephora	A4GE70.2	N1、N3

系统发生树



咖啡和茶树分别分在不同分支，说明来自茶和咖啡的N-甲基转移酶是从两个独立的起源进化而来的。CkCS与N1、N3甲基转移酶分在一支，CkTbS与N3甲基转移酶分在一支，与酶动力学分析的结果一致。



CkTbS三级结构
PDB登录号: 6LYI



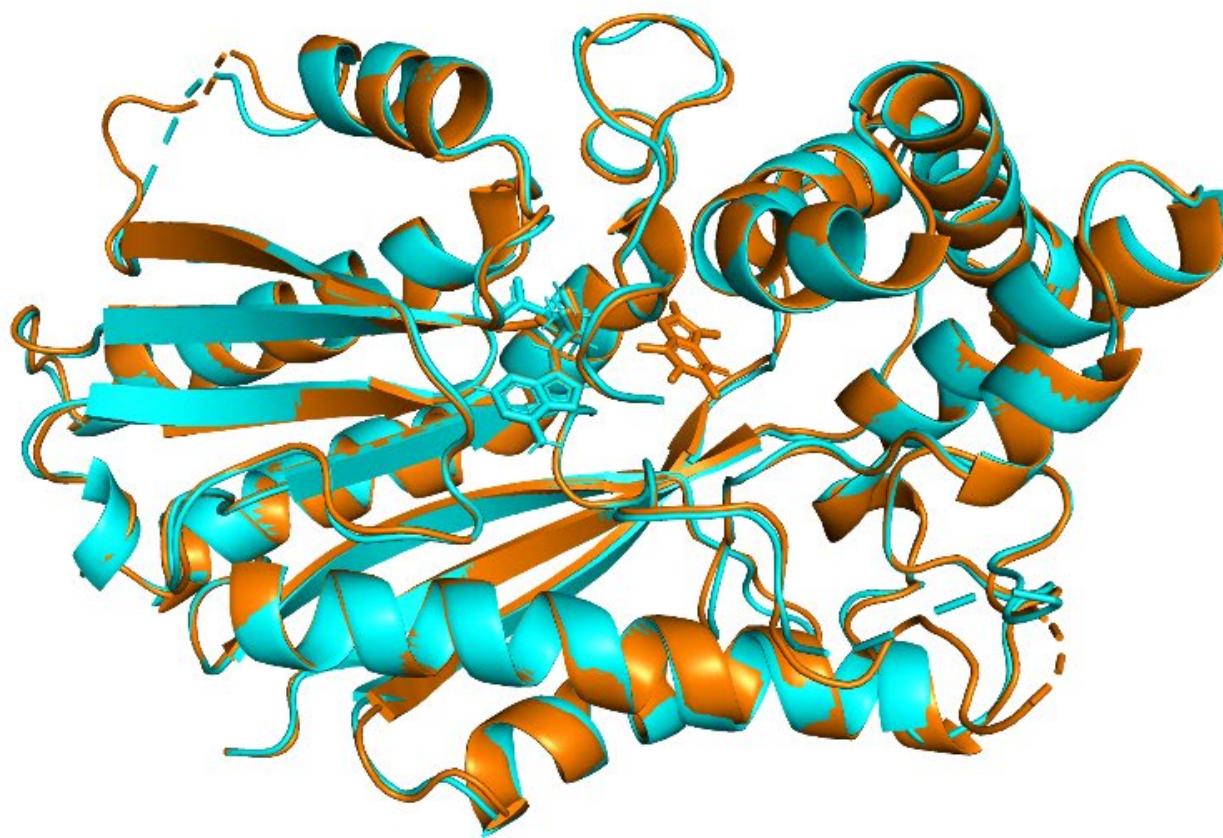
茶树咖啡碱合成酶三级结构
(Swiss-Model 预测)



CkCS三级结构
(Swiss-Model 预测)

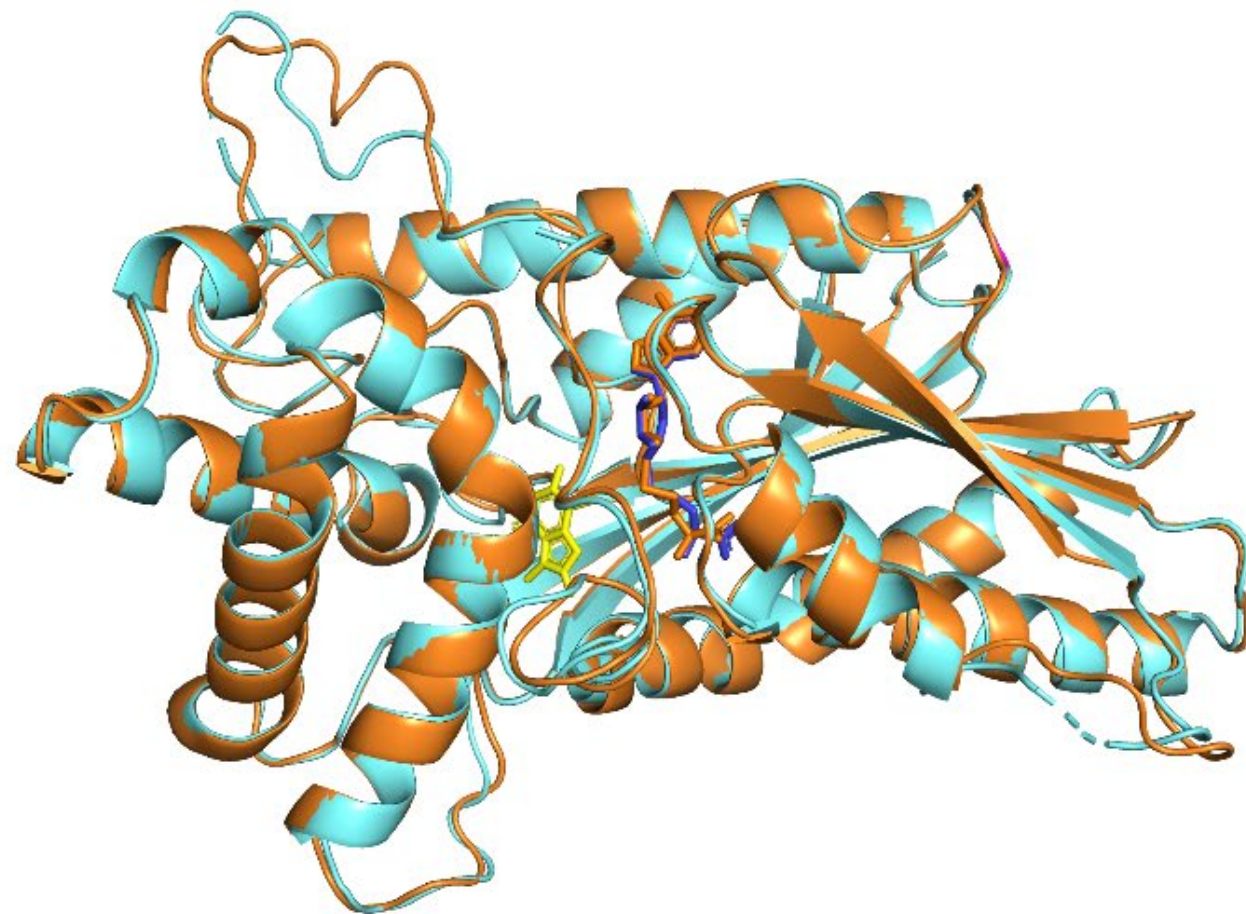
苦茶碱合成酶CkTcS与茶树咖啡碱合成酶比对

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
714 bits(1842)	0.0	Compositional matrix adjust.	342/370(92%)	355/370(95%)	1/370(0%)



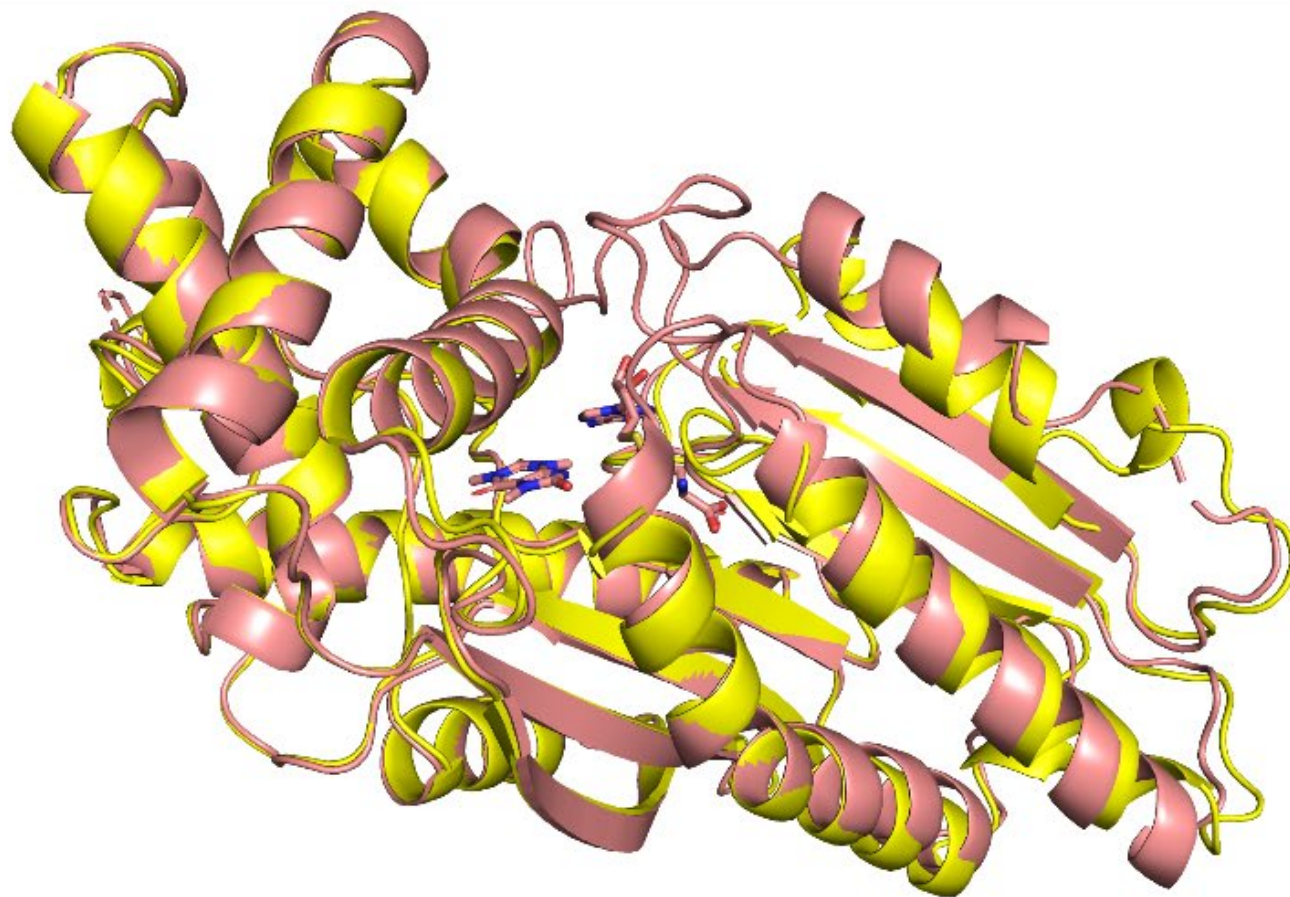
苦茶碱合成酶CkTcS与CKCS比对

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
709 bits(1831)	0.0	Compositional matrix adjust.	339/370(92%)	355/370(95%)	1/370(0%)



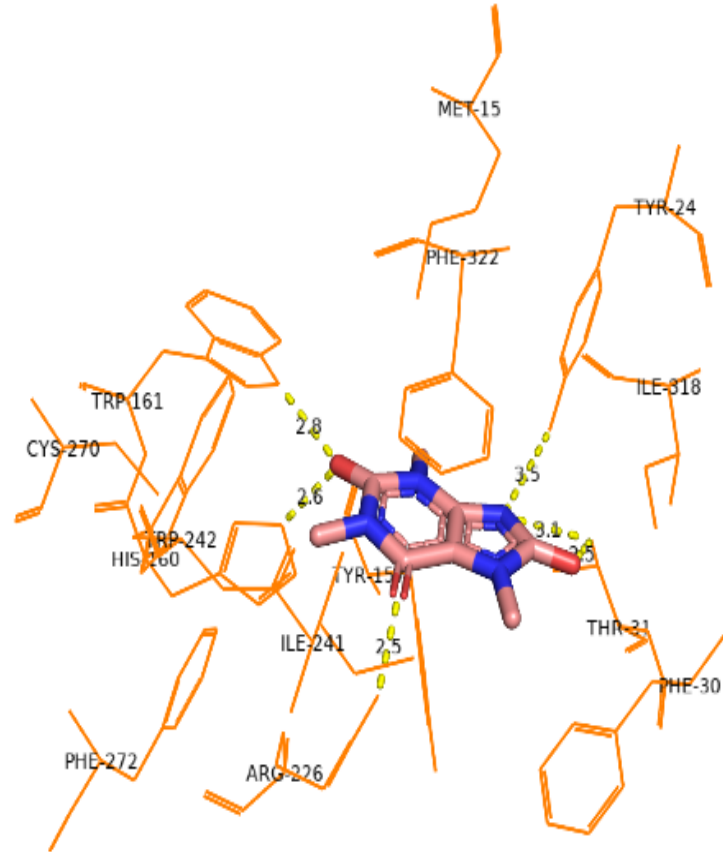
苦茶碱合成酶CkTcS与CkTbS比对

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
717 bits(1851)	0.0	Compositional matrix adjust.	341/370(92%)	355/370(95%)	0/370(0%)



- 观察苦茶碱合成酶CkTcS与茶树咖啡碱合成酶、CkTbS、CkCS的结构发现，只有CkTcS存在1,3,7-三甲基尿酸这一配体。结构比对结果显示苦茶碱合成酶CkTcS与茶树咖啡碱合成酶、CkTbS、CkCS的结构均非常相似，表明CkTcS与1,3,7-三甲基尿酸这一底物的结合不会诱导大的构象变化，所以CkTcS的底物特异性可能是由微小的可变残基决定的。

苦茶碱合成酶CkTcS与1,3,7-三甲基尿酸相互作用的氨基酸位点



多序列比对差异位点

1. TCS1f	I	L	R	G	R	C	F	T	W	E	P	C	Y	F	K	V	V	R
2. CkTcS	I	L	R	G	R	C	F	I	W	E	P	C	Y	F	K	I	V	R
3. CkTbS	I	L	H	G	R	C	F	T	W	E	P	S	Y	F	K	M	V	R
4. CkCS	I	L	R	G	R	C	F	T	W	E	P	S	Y	F	K	V	V	R

226 241 270 318

- 查阅文献可知，CkTcS、CkTbS、CkCS的底物结合口袋周围存在三个可变残基，分别是：
- CkTcS_Arg-226 (CkTbS_His-226, CkCS_Arg225), CkTcS_Ile-241 (CkTbS_Thr-241, CkCS_Thr-240), CkTcS_Cys-270 (CkTbS_Ser-270, CkCS_Ser-269)
- 在CkTcS中除了Arg-226, Ile-241和Cys-270都不参与与1,3,7-三甲基尿酸的直接相互作用。
- 将CkTbS的226位His突变为Arg, 用1,3,7-三甲基尿酸做底物, 经体外实验发现, 突变体催化1,3,7-三甲基尿酸的N9位甲基化的活性增加。
- 在体外实验中, 用1,3,7-三甲基尿酸做底物, CkTbS的T241I或S270C的单突变导致反应产物的适度增加, 双突变和三突变使N-甲基转移酶活性增加进一步增加。
- 这些结果表明CkTcS的Arg-226在1,3,7-三甲基尿酸的结合和1,3,7-三甲基尿酸的N9甲基化的正确定位中起着积极的作用。Ile-241和Cys-270也是不可或缺的。

参考文献

- Zhang, Y.H., et al. Identification and characterization of N9-methyltransferase involved in converting caffeine into non-stimulatory theacrine in tea[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 1473.

**thanks for
your attention**