

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18690

研究課題名(和文)植物香気物質フェニルプロペン生合成経路の解明と代謝工学

研究課題名(英文)Elucidation of phenylpropene biosynthetic pathway leading to aromatic compounds in plants and its application to metabolic engineering

研究代表者

肥塚 崇男 (Koeduka, Takao)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教

研究者番号：30565106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、芳香族香気成分であるフェニルプロペン類を高生産する植物種を探索し、フェニルプロペン類の多様性に関わるメチレンジオキシ環化酵素およびプレニル化酵素の単離、機能解析を行った。その結果、セリ科のディル、チャービル、パセリ、シキミ科のシキミ、ウマノスズクサ科のカンアオイにおいてミリスチシンやディルアピオール、ジメチルアリルオイゲノールなどフェニルプロペン類が高生産されることを明らかにした。さらに、メチレンジオキシ環化酵素およびプレニル化酵素をコードすると推定される酵素遺伝子をディルおよびシキミから単離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a screening of plants producing high levels of aromatic volatile compounds, phenylpropenes, and isolation of methylene-dioxy bridge forming enzymes and prenyltransferase, which are responsible for the diversification of phenylpropene structures. As the results, we found that dill, chervil, parsley, basil, illicium, and wild ginger produce high amounts of phenylpropenes including myristicine, dillapiole, and dimethylallyl eugenol. In addition, we successfully isolated putative genes encoding methylene-dioxy bridge forming enzymes and prenyltransferase from dill and illicium.

研究分野：植物生化学

キーワード：香気成分 二次代謝産物

## 1. 研究開始当初の背景

植物が作り出す香り成分は、植食昆虫や病原菌に対する防衛物質としてはたらくだけでなく、植食者の天敵や受粉媒介者を誘引するための情報化学物質としても機能している。その中でもベンゼン環に直鎖状プロペンが結合した C6-C3 構造を基本骨格とするフェニルプロペン類はペチュニアやバラをはじめとする顕花植物の主要香り成分として、ハーブや香辛料の特徴的な香り成分として知られている。このようなフェニルプロペン類はわずかな化学構造の違いにより、その香り特性や生理活性が異なることが報告されている。例えば、フェニルプロペン類のフェノール性水酸基の存在が灰色かび病など糸状菌の菌糸生育阻害や孢子発芽抑制活性に大きく関わっている。一方で、植物が生合成するポリフェノールにはプレニル化や配糖化、メチレンジオキシ環化されたものが多い。これらポリフェノール類は修飾される前の母核構造にはない高い生理活性を有することが知られている。フェニルプロペン類の一種であるオイゲノールがプレニル化されると、修飾される前には見られない顕著なハダニ産卵抑制活性を示すと報告がある。このような多彩な生理活性を示すフェニルプロペン類は化粧品業界や農業・園芸分野で注目されている。しかしながら、オイゲノールを含むフェニルプロペン類のベンゼン環構造の多様性における生成機構については未解明な部分が多く、多様な生理活性を持つフェニルプロペン類の創出のためには様々な植物におけるフェニルプロペン類生合成遺伝子の単離、機能解明という基礎的な研究が求められていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、様々な植物に存在するフェニルプロペン類の構造多様性に関わる生合成遺伝子、特にメチレンジオキシ環化およびプレニル化反応を触媒する酵素遺伝子の機能を明らかにし、それら遺伝子を利用した植物代謝工学への応用を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料の選定

これまでの文献情報を基にフェニルプロペン類が含まれるとされる植物並びに、身のまわりで入手しやすい植物計 20 種 (ダイコン、シロイヌナズナ、タバコ [*Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*]、ペパーミント、バジル、ローズマリー、パセリ、パ슬レー、ディル、ニンジン、セロリ、ミツバ、チャービル、シュンギク、ネギ、シキミ、ビワ、カンアオイ、マンゴー) を集め、それぞれの葉から揮発性化合物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) により網羅的な香り成分分析を行った。

### (2) RNA-seq を用いたトランスクリプトーム

## 解析

メチレンジオキシ環化もしくはプレニル化されたフェニルプロペン類を多く含むディルおよびシキミから total RNA を調製し、RNA-seq に供した。ディルにおいては、発芽 6 日後および 9 日後の実生、発芽 14 日後の地上部および地下部、成熟した植物体における葉および花の計 6 サンプルを用いた。一方、シキミにおいては成熟葉を用いた。得られたシーケンスデータからコンティグを作成し、RPKM 値 (遺伝子発現量に相当) とフェニルプロペン生成量の相関解析を行い、候補遺伝子の検討を行った。

### (3) 組織別遺伝子発現解析

ディルの RNA-seq に用いた 6 つの RNA サンプルから逆転写反応により 1 本鎖 cDNA を合成し、上述 2) と同様に組織別における遺伝子発現を RT-PCR により解析した。各組織間でのテンプレート量を比較するための指標として、ハウスキーピング遺伝子であるアクチンの発現量も同時に解析した。

### (4) RNA-seq および組織別遺伝子発現情報を基にした全長 cDNA のクローニング

フェニルプロペン蓄積量と遺伝子発現プロファイルに相関が見られたコンティグの全長配列を、ディル実生の 1 本鎖 cDNA から PCR により pGEM-T easy ベクターにサブクローニングした。その後、得られた全長 cDNA コード領域をシーケンス解析により配列確認し、植物発現用バイナリーベクター pRI101 もしくは酵母発現用ベクター pESC-LEU にサブクローニングした。

### (5) 組換え酵素の発現と酵素アッセイ系

酵素アッセイ系は Munakata ら (Plant Physiol., 2014) の方法に準じ、タバコ葉での一過的発現系もしくは酵母を発現宿主とした組換え酵素発現系でタンパク質を調製し、酵素反応生成物を GC もしくは GC-MS 分析に供した。候補遺伝子を導入した pRI101 ベクターをアグロバクテリウム GV3101 に形質転換した。このアグロバクテリウムを野生タバコ (*Nicotiana benthamiana*) にインジェクションし、2 日間培養した。その後、感染した葉に基質であるオイゲノールを浸透させ、発現タンパク質の代謝物変換能を調べた。一方で、pESC-LEU ベクターにクローニングした遺伝子は酵母 CEN-PK2 株を用いて発現させた。この CEN-PK2 株の培養液に基質であるオイゲノールを投与し、24 時間後に代謝物を有機溶媒で抽出し、GC 分析に供した。酵素反応生成物の標品は市販品もしくは Koeduka ら (Plant Biol., 2014) の方法により合成したものをを用いた。

## 4. 研究成果

(1) 様々な植物種におけるフェニルプロペン類の分析

有機溶媒抽出法により各植物種から揮発性化合物を抽出し、GC-MSによりフェニルプロペン類の定量解析を行った。その結果、セリ科のチャービル、バジル、パセリ、パスレー、ディル、シキミ科のシキミ、ウマノスズクサ科のカンアオイにおいてフェニルプロペン類が高蓄積していることがわかった。特にシキミにおいては、メチレンジオキシ環をもつサフロール、プレニル基をもつジメチルアリルオイゲノールが検出された。さらに、ディルではメチレンジオキシ環構造を有するミリスチシン、ディルアピオール、アピオールが主要香気成分として検出され、実生段階（発芽6日、9日、14日後）で高生産される一方、開花期の植物体では全く生成されず、生育段階特異的な蓄積パターンを示すことがわかった。

### (2) ディル、シキミの遺伝子発現データベースからのデータマイニング

フェニルプロペン類が多く検出されたディルおよびシキミから抽出した total RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。de novo アセンブルによって構築したコンティグに対して、既知のフラボノイドを基質とするプレニル化酵素もしくはアルカロイドやリグナンを基質とするメチレンジオキシ環化酵素 (P450) をクエリーに用いて tblast 解析を行い、候補遺伝子の探索を行った。その結果、シキミから芳香族プレニル化酵素ファミリーに属するコンティグを6種見出し、そのうち系統樹解析上、比較的独立したクラスターを形成するコンティグを2種類見出した。また、ディルからは343個の P450-like gene を獲得した。

### (3) RT-PCR による遺伝子発現解析

ディルでは、実生で多く、開花期で少ないという生育段階特異的なフェニルプロペン類の蓄積傾向が見られた。このことからフェニルプロペン生合成経路上の遺伝子発現が、フェニルプロペン類の蓄積パターンと同様の発現様式を示すのか RT-PCR により解析を行った。その結果、生合成経路上流に位置する酵素遺伝子である coniferyl alcohol acetyltransferase (CFAT) および eugenol synthase (EGS) は、実生で高発現し、開花期で発現量が低いというフェニルプロペン蓄積量と正の相関を示した。この結果から、オイゲノールをメチレンジオキシ環化する候補遺伝子も同様の発現様式を示すことが推測され、上述で選定した343個の P450-like gene のうち、実生で特異的に高発現する12種類の候補遺伝子を見出した。

### (4) シキミ由来プレニル化酵素のタバコ葉における一過的発現解析

シキミからプレニル化酵素をコードすると思われる2種類のコンティグを単離し、そのうちの1つ (unigene\_2038) について、ア

グロバクテリウムを介してタバコ葉 (*N. benthamiana*) で一過的発現させ、基質であるオイゲノールを投与し、代謝物変換解析を行った。代謝変換物を GC 分析に供したが、オイゲノールがプレニル化されたジメチルアリルオイゲノールは検出されなかった。現在、残りの候補遺伝子についても同様の解析を進めている。

### (5) ディル由来メチレンジオキシ環化酵素の酵母による異種発現

上述で選定した12個の P450-like gene のうち、全長遺伝子を含む3つの cDNA (unigene\_1651, unigene\_9815, unigene\_12804) を酵母発現系ベクターに導入し、酵母 CEN-PK2 株においてシロイヌナズナの P450 NADPH 還元酵素と共発現させた。この発現酵母培養中にオイゲノールを基質として添加し、代謝物変換され生成するサフロールを GC 分析により検出した。しかしながら、今回クローニングした3つの遺伝子の中からはメチレンジオキシ環化形成能は見出せなかった。現在、引き続きの残りの候補遺伝子の全長遺伝子配列のクローニング、代謝物変換解析を行っている。一方で、ゼニゴケから単離した P450 (cinnamic acid 4-hydroxylase: C4H) を同じ酵母発現系で組換えタンパク質を調製し、cinnamic acid から *p*-coumaric acid への変換を確認することができた。以上のことから、酵母を用いた P450 発現系ならびに代謝物変換系の構築が確立できた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

1. Koeduka T\* (2018). Functional evolution of biosynthetic enzymes that produce plant volatiles. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82, 192-199. (査読有)
2. Koeduka T\*, Fujita Y, Furuta T, Suzuki H, Tsuge T, Matsui K (2017). Aromatic amino acid decarboxylase is involved in volatile phenylacetaldehyde production in loquat (*Eriobotrya japonica*) flowers. *Plant Biotechnology*, 34, 193-198. (査読有)
3. Fujita Y, Koeduka T\*, Aida M, Suzuki H, Iijima Y, Matsui K (2017). Biosynthesis of volatile terpenes that accumulate in the secretory cavities of young leaves of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*): Isolation and functional characterization of monoterpene and sesquiterpene synthase genes. *Plant Biotechnology*, 34, 17-28. (査

- 読有)
4. Koeduka T\*, Kajiyama M, Furuta T, Suzuki H, Tsuge T, Matsui K (2016). Characterization of an *O*-methyltransferase specific to guaiacol-type benzenoids from the flowers of loquat (*Eriobotrya japonica*). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122, 679-684. (査読有)
  5. Koeduka T\*, Kajiyama M, Suzuki H, Furuta T, Tsuge T, Matsui K (2016). Benzenoid biosynthesis in the flowers of *Eriobotrya japonica*: molecular cloning and functional characterization of *p*-methoxybenzoic acid carboxyl methyltransferase. *Planta*, 244, 725-736. (査読有)
  6. Koeduka T\*, Ishizaki K, Mwenda CM, Hori K, Sasaki-Sekimoto Y, Ohta H, Kohchi T, Matsui K (2015). Biochemical characterization of allene oxide synthases from the liverwort *Marchantia polymorpha* and green microalgae *Klebsormidium flaccidum* provides insight into the evolutionary divergence of the plant CYP74 family. *Planta*, 242, 1175-1186.(査読有)
  7. 肥塚崇男(2016). 「みどりの香り」をつくる酵素. *日本生物工学会誌*, 第3号, pp.3. (査読有)
  8. 飯島陽子, 肥塚崇男 (2016). 香辛植物の香りの生合成とバイオテクノロジー. *香料*, 第270号, pp.31-39. (査読有)
  9. 肥塚崇男(2016). 葉の香りとは. *Aroma Research*, 第17巻, 第4号(通巻68号), pp.29-31. (査読有)
  10. 松井健二, 肥塚崇男 (2015). みどりの香りの生合成機構 膜脂質上での酸化開裂反応. *化学と生物*, 第53巻, 第1号, pp.2-4. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1. 肥塚崇男, 畑田 珠希, 鈴木 秀幸, 鈴木 史朗, 松井 健二 (2017). ショウブ由来レスベラトロール *O*-メチル基転移

- 酵素の機能解析. 第35回日本植物細胞分子生物学会大会. 2017年8月30日. 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
2. 肥塚 崇男 (2017). 植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究. 日本農芸化学会2017年度大会. 農芸化学奨励賞受賞講演. 2017年3月19日. 京都女子大学(京都府京都市)
  3. 藤田 芳勸, 飯島 陽子, 相田 光宏, 鈴木 秀幸, 松井 健二, 肥塚 崇男 (2017). サンショウ油胞特異的に蓄積する揮発性テルペンの生成に関する研究. 日本農芸化学会2017年度大会. 京都女子大学(京都府京都市)
  4. 肥塚 崇男 (2017). 植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究. 日本農芸化学会中四国支部 第48回講演会(例会). 農芸化学奨励賞受賞講演. 徳島大学(徳島県徳島市)
  5. 肥塚 崇男, 鈴木 史朗, 飛松 裕基, 宮本 託志, 梅澤 俊明, 松井 健二 (2016). フェニルプロペン香気成分の生合成に関わるモノリグノールアセチル化酵素遺伝子の単離と機能解析. 第61回リグニン討論会. 京都大学(京都府宇治市)
  6. 肥塚 崇男, 梶山 眞未, 望月 智史, 古田 巧, 鈴木 秀幸, 柘植 知彦, 松井 健二 (2016). ピワの揮発性ベンゼノイド生合成に関与するカルボン酸メチル化酵素の機能解析. 第34回日本植物細胞分子生物学会大会. 信州大学(長野県上田市)
  7. 肥塚 崇男 (2016). 植物香気成分の多様性と生合成酵素の機能進化. 日本農芸化学会中四国支部 第23回若手シンポジウム. 岡山大学(岡山県岡山市)

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥塚 崇男 (KOEZUKA TAKAO)

山口大学・大学院創成科学研究科・助教

研究者番号：30565106

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし