

令和元年6月3日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18653

研究課題名(和文) トマト果実における香気成分の貯蔵メカニズムの解明

研究課題名(英文) Storage mechanism of flavor volatiles by glycosylation in tomato fruit

研究代表者

上吉原 裕亮 (KAMIYOSHIHARA, Yusuke)

日本大学・生物資源科学部・専任講師

研究者番号：00758394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トマトには400種類以上の香気成分が含まれており、果実の食味に大きな影響を与える。このうち、ヒドロキシ基を持つ成分は、香り形成に特に重要であり、細胞内に配糖体型として多量に蓄積する。本研究では、トマト果実において香気成分の配糖体化に関わる酵素(UGT)の同定および機能解析を行った。組換えタンパク質を用いたスクリーニングにより、配糖体化活性を有するいくつかの新奇UGTの同定に成功した。例えば、低温貯蔵した果実において高発現するUGTは、2-フェニルエタノールなど複数の香気成分を配糖体化した。本研究ではさらに、各UGTの形質転換体を作成し、果実中の香気成分および配糖体量に与える影響を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トマト果実の香り形成において重要な香気成分の配糖体化に関わる複数の候補UGTを同定した。この知見は、香気成分をターゲットとした分子育種やメタボリックエンジニアリングにより優れた香りを持つ品種を育成する上で役立てることができる。配糖体化は香りを果実内に“パッキング”することと同義であり、配糖体型が多ければ果実を食べた時あるいは加工した際に糖が解離し、豊かな香りを放つようになると思われる。本研究の成果は、将来的に香り豊かな果実を作出するための有効なステップであると思われる。また、他の果実や花卉類・ハーブ類など、香りが品質決定の重要な要因となる作物の研究にも生かされると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tomato fruit contains over 400 flavor volatiles. The composition of volatiles largely influences the fruit taste. Many of alcoholic volatiles having a hydroxyl group are important to determine the tomato flavor. Significant level of alcoholic volatiles is stored in glycosylated forms that are non-volatile and odorless. However, they are de-glycosylated by the action of hydroxylases and reversibly becomes volatile, meaning that the glycosylated form is a pool to provide volatiles to impact on the flavor. We aimed to identify and characterize glycosyltransferases (UGT) that acts on volatiles. In vitro screening with recombinant UGTs allowed us to identify multiple novel UGTs having volatile glycosylation activity. For instance, a UGT that is highly expressed in chilled tomato displayed the activity against wide range of alcoholic volatiles such as 2-phenylethanol having floral odor. Further, transgenic tomato plants of UGTs were generated and the role of each UGT was validated.

研究分野：農学

キーワード：香り 香気成分 果実 トマト グリコシルトランスフェラーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の二次代謝産物は、園芸作物においては付加価値 (外観, 栄養価など) を与える成分であり、品質を左右する重要なファクターである。その中で、芳香を有する揮発性成分は、園芸作物の「香り形成」や「食味決定」に深く関わっている。果実の場合は特に、甘味や適度な酸味に加え、“香り”という形質が食味決定に深く関わっている(図1, 文献)。しかし、近年は多くの園芸作物において、本来の香りが失われてきていることが指摘されている。この原因として、収量性や耐病性を重視した育種過程で香りという形質が無視されてきたことが大きいと考えられている。

果実に含まれる多様な香気成分はアミノ酸や脂肪酸、色素関連化合物に由来しているが、その代謝経路や介在する遺伝子は未同定のものが多い。今後、香気成分をターゲットとした戦略的な分子育種やメタボリックエンジニアリングにより優れた香りを持つ品種を育成するためには、各成分の代謝経路や、植物組織からの揮散メカニズムに関する分子レベルの基礎研究が不可欠となる(文献)。

本研究では、香り研究における最重要課題の一つとして、香気成分の配糖体化に焦点を当てた。香気成分はグルコースなどの糖が結合すると、揮発性が失われ無香性となり(図2) 液胞内に貯蔵されると考えられている。ところが、人が咀嚼する際に細胞が壊れると、細胞質に局在する glycosidase と会合し、糖が解離して再び揮発性を持つようになる。つまり、配糖体型のプールは“香りの源”であると言える。配糖体型のプールの大きさを決定する鍵となるのは、香気成分に糖を付加する UDP-dependent glycosyltransferase (UGT) である。フラボノイドや植物ホルモンの配糖体化に関わる UGT は数多く同定されているが、香気成分の配糖体化を担う UGT はほとんど明らかになっていない。UGT を介した香気成分の配糖体化による貯蔵メカニズムを解明することにより、将来的に果実をはじめとする園芸作物の香りの質や強弱を調節するために役立てることができると考えられる。

## 食味 (Flavor)



図1. 食味を構成する要素。  
果実の場合、甘味・酸味に加えて香りが重要となる。

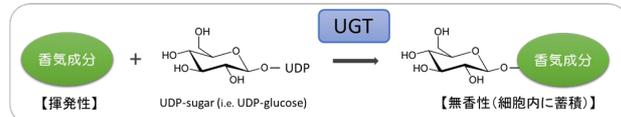


図2. UGTによる香気成分の配糖体化。  
UDP結合型の糖を共基質として、糖を香気成分に付加する。

### 2. 研究の目的

本研究では、果実研究のモデル植物であるトマトを対象とし、香気成分量の調節に関わる配糖体化に着目した。トマト果実にはそれぞれ特有の芳香を持つ400種類以上の香気成分が含まれている。ヒドロキシ基を有する香気成分は、果実の香り形成において重要であり、糖修飾のターゲットとなることが知られている(文献)。特にフローラルな芳香を持つ2-フェニルエタノールやベンジルアルコールなどは相当量が配糖体型として果実組織に貯蔵されていることが報告されており、香りの供給源としてのポテンシャルの高さが推定される。一方、トマトゲノム中には、200以上のUGT遺伝子がコードされているが、多くのUGTはその基質や生理学的な機能は未解明の状況である。本研究では、トマト果実において香気成分の配糖体化に関わるUGTの同定および機能解析を行い、配糖体化が果実の香り形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 香気成分の配糖体化に関わる候補UGT遺伝子の探索

トマトゲノム中に存在する多数のUGT遺伝子群の中から、香気成分の配糖体化に関わるUGTを同定するために、以下の2つのストラテジーを実施した。なお、香気成分組成はガスクロマトグラフィーにより分析した。

生化学的手法によるスクリーニング: 候補となるUGTを大腸菌内で発現させ、得られた組換えタンパク質の香気成分に対する配糖体化活性を測定した。

遺伝的多様性を利用したアプローチ: トマトの香気成分の配糖体量は、品種間で大きく異なることが報告されている。この原因因子となっているのがUGTである可能性は高いと考えられた。多様な品種・系統における配糖体量を分析し、顕著な差異が見られる系統間でRNA sequencingによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。

#### (2) 配糖体化活性を持つUGTの機能解明

上記ストラテジーにより選定されたUGTについて、詳細な機能解析を行った。候補UGTをアグロバクテリウムを利用した *Nicotiana benthamiana* における一過的発現系による解析に供し、生体内における香気成分に対する配糖体化活性を検証した。また、形質転換トマトを作成し、UGTが生体内で真に香気成分の配糖体化を担っているかどうかを検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) 香気成分の配糖体化に関わる候補UGT遺伝子の探索

RNA sequencing データより、果実において遺伝子発現量の高いUGT遺伝子を約30選定し、大腸菌内で組換えタンパク質を発現させ、香気成分に対する配糖体化活性の有無を調べた。活

性測定には、配糖体型としてトマト果実に多く含まれる香気成分を基質として用いた(図3)。その結果、複数のUGTが香気成分の配糖体化活性を持つことが明らかになった。たとえば、未熟果実において高発現を示すいくつかのUGTは、スモーキーフレーバーに関わる香気成分(グアイアコール、オイゲノール)に対する活性を示した。また、低温貯蔵した成熟果実において強く発現するUGTは、2-フェニルエタノール(フローラル香)やヘキサノール(グリーン香)など、トマトの香り形成に重要な複数のアルコール性香気成分に対して活性を有していた。低温貯蔵したトマト果実では、揮発性の香気成分量が著しく減少するが、配糖体型の含有量は一定であった。したがって、このUGTが低温条件において果実組織内の香気成分量を維持する役割を果たしていることが推察された。

一方、国内外のおよそ50品種のトマト果実における香気成分および配糖体量を分析したところ、品種間で大きな差異が見られた。配糖体量の異なる品種群間でRNA sequencingによる遺伝子発現解析を実施したところ、UGT遺伝子の発現量については品種間で有意な差異は見られなかった。配糖体量の品種間差異は、UGT機能以外の要因により生み出されると考えられた。

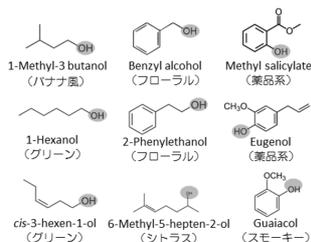


図3. 配糖体化アッセイに用いる基質の一部。灰色で示したOH基に糖が結合する。

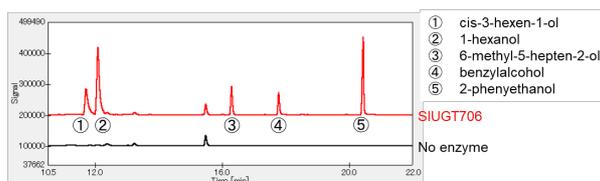


図4. 大腸菌で発現させたUGTの配糖体化活性の検出。精製したUGTタンパク質をUDP-グルコース存在下で香気成分と反応させ、生成された配糖体を加水分解し、ガスクロマトグラフィーによる分析に供した。

## (2) 配糖体化活性を持つUGTの機能解明

上記の手法により選定されたUGTを、アグロバクテリウムを介した*N. benthamiana*における一過的発現系による解析に供した。いずれのUGTを発現させた場合にも植物組織内に取り込ませた香気成分の配糖体化が認められた(図5)。配糖体化された香気成分の種類については、上述の*in vitro*の結果をほぼ反映していた。したがって、これらのUGTが生体内においても機能し得ることが明らかになった。

さらに、形質転換トマトを作出し、候補UGTがトマト果実の香気成分の配糖体量に与える影響について検証した。UGTの過剰発現体の果実では、揮散される香気成分が減少し、配糖体の蓄積量が増加することが期待されたが、実際には大きな影響は見られなかった。揮発型と配糖体型は可逆的な変換であるため、人為的にUGTを過剰発現させた場合、細胞内において両者のバランスを保つための補償作用により、UGTの効果が打ち消されたためと考えられる。今後は、ゲノム編集によるUGT遺伝子のノックアウト個体の作出および分析を行い、配糖体化反応を抑えた場合の香気成分組成への影響を調べる予定である。

近年、国内外の研究グループにより、いくつかの園芸作物において香気成分の配糖体化に関わるUGTが報告されている(文献)。これらの研究により、配糖体化の重要性が示されてきているが、トマト果実における配糖体化については、これらの研究報告との相違点も存在しており、植物種ごとに配糖体化による香気成分の貯蔵について、独自の代謝サイクルが存在する可能性が考えられる。

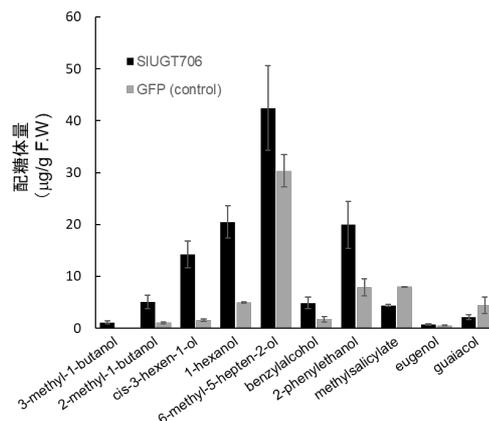


図5. *N. benthamiana*におけるUGTの配糖体化活性の検出。アグロバクテリウムを介してUGTを一過的に発現させ、外部から取り込ませた香気成分の配糖体量を測定した。

## 引用文献

- Klee H. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology (2010) *New Phytologist* 187: 44-56.
- Klee H, Tieman D. The genetics of fruit flavour preferences (2018) *Nature Reviews Genetics* 19: 347-356.
- Birtic S, Ginies C, Causse M, Renard CM, Page D. Changes in volatiles and glycosides during fruit maturation of two contrasted tomato (*Solanum lycopersicum*) lines (2009) *J. Agric. Food Chem.* 57: 591-598.
- Song C, Hartl K, McGraphery K, Hoffmann T, Schwab W. Attractive but Toxic: Emerging roles of glycosidically bound volatiles and glycosyltransferases involved in their formation (2018) *Molecular Plant* 11: 1225-1236.

〔雑誌論文〕(計3件)

Shinji Mizuno, Yusuke Kamiyoshihara, Hajime Shiba, Fumie Shinmachi, Keiichi Watanabe, Akira Tateishi, Plastidial Starch Phosphorylase is Highly Associated with Starch Accumulation Process in Developing Squash (*Cucurbita* sp.) Fruit. (2019年) *Physiologia Plantarum*, 印刷中. 査読あり <https://doi.org/10.1111/ppl.12886>.

Yusuke Kamiyoshihara, Shinji Mizuno, Mirai Azuma, Fumika Miyohashi, Makoto Yoshida, Junko Matsuno, Sho Takahashi, Shin Abe, Hajime Shiba, Keiichi Watanabe, Hiroaki Inoue, Akira Tateishi, Opposite Accumulation Patterns of Two Glycoside Hydrolase Family 3  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase Proteins in Avocado Fruit during Ripening (2018年) *The Horticulture Journal*, 87: pp. 430-435. 査読あり <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-142>.

Yusuke Kamiyoshihara, Takuya Nakamura, Yasuharu Itagaki, Shinichi Asada, Takashi Aoki, Shinji Mizuno, Keiichi Watanabe, Hiroaki Inoue, Akira Tateishi, Differential Constitution in Promoter Region Leads to a Phenotype with a Lower Allergic Actinidin Level in Yellow-fleshed Kiwifruit (*Actinidia chinensis*) (2018年) *The Horticulture Journal*, 87: pp. 288-296. 査読あり <https://doi.org/10.2503/hortj.OKD-133>.

〔学会発表〕(計6件)

小根山瑞葉・上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・立石亮, トマトにおける香り成分糖体化酵素の同定および機能解析, 平成30年度園芸学会秋季大会, 2018年.

宮島桜子・上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・立石亮, トマト近縁種果実におけるエステル系香り成分代謝関連酵素の機能解析, 平成30年度園芸学会秋季大会, 2018年.

帰山えり子・上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・立石亮, トマトの低温追熟で誘導される遺伝子群と異常食感の関係, 平成30年度園芸学会秋季大会, 2018年.

小根山瑞葉・宮島桜子・立石亮・上吉原裕亮, トマト果実に含まれるアルコール性香り成分の代謝機構, 第14回 Japan Solanaceae Consortium (日本ナス科コンソーシアム), 2017年.

上吉原裕亮・水野真二・渡辺慶一・立石亮, トマト果実の香り成分糖体化に関わるグリコシルトランスフェラーゼの探索, 平成29年度園芸学会春季大会, 2017年.

上吉原裕亮, トマト果実に含まれる香り成分に関する研究, 平成28年度園芸学会秋季大会小集会, 2016年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名: 立石 亮  
ローマ字氏名: TATEISHI, Akira  
日本大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号: 30267041

研究協力者氏名: KLEE, Harry  
University of Florida, Horticultural Sciences Department・教授

研究協力者氏名: GOULET, Charles  
Laval University, Department of Phytology・准教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。