

令和 4 年 10 月 21 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07750

研究課題名(和文)植物防御応答を司る「香り」の配糖化メカニズムの解明

研究課題名(英文)Functional characterization of aroma glycosylation in plant chemical defense

研究代表者

大西 利幸(Ohnishi, Toshiyuki)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60542165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物防御応答を司る「香り」の配糖化メカニズムの解明を目的に、チャ、バラ、サツマイモなどの香気配糖化酵素の探索・同定・機能解明を行った。その結果、揮発性化合物であるテルペンアルコール、芳香族アルコール、脂肪族アルコールを糖受容体とする香気配糖化酵素を複数見出した。これら揮発性化合物が各種病原菌に対して高い抗菌活性を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物における配糖体の時間的・空間的貯蔵の仕組み、配糖化酵素の同定、配糖体の生理生態学的意義を明らかにすることを目的とする。本研究を通して、「香り」の受容機構の一つである“配糖化反応”を分子レベルで解明することで、植物の環境防御応答に関する新しい概念を提案することを目指した。特に、サツマイモにおける香気配糖化メカニズムを分子レベルで解明することを目的に、香気配糖化酵素の単離・同定および酵素機能の解明において成果を得た。サツマイモは食用植物でもあり、サツマイモの食味のみならず揮発性化合物を用いた防御機構の解明の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：aroma volatiles function as chemical defense molecules against fungi and insects. aroma volatiles are stored as glycosides in the tuber of sweet potatoes, in the young leaves in tea, flowers in rose. Glycosylation of aroma volatiles contributes to the stable storage of aroma volatiles by reducing their volatility. Aroma glycosides are biosynthesized by UDP-sugar dependent glycosyltransferases (UGT). In this study, we enzymatically characterized that a UGT involved in aroma glycosylation in sweet potatoes, rose, tea.

研究分野：植物化学

キーワード：配糖体 テルペン 香り

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、“Specialized metabolites” と呼ばれる植物の二次代謝産物には数多くの生理活性物質が存在する。化学生態学的研究や分子生物学的研究の進展に伴い、多くの二次代謝産物は環境ストレス（昆虫食害や病原菌感染など）から身を守るための化学防御物質として機能していることが報告され、また二次代謝産物は、植物間や植物と他の生物間の情報伝達物質としての役割を担っていることも報告されている。その中でも、植物が発散する揮発性化合物は、大気中を漂うことができるため空間的広がりによって優れており、植物が外界とのコミュニケーションを図るための重要なケミカルツールである。近年、植物が、揮発性化合物を取り込み、配糖化して植物体内に貯蔵することで、植物間の情報伝達を行っていることが報告され、環境ストレスに曝された植物が放散する揮発性化合物は、植物間コミュニケーションに重要な役割を演じていることが注目されている。しかし、植物が、大気を介した「香り」を「いつ」、「どこで」、「どのように」配糖化するのかが、未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究課題「植物防御応答を司る「香り」の配糖化メカニズムの解明」は、植物、特にバラやサツマイモ、チャなど豊富な香気配糖体を含む植物種における配糖体の時間的・空間的貯蔵の仕組み、配糖化酵素の同定、配糖体の生理生態学的意義を明らかにすることを目的とする。本研究を通して、「香り」の受容機構の一つである“配糖化反応”を分子レベルで解明することで、植物の環境防御応答に関する新しい概念を提案することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 香気配糖体の定量分析

植物サンプルを液体窒素で凍結破碎した後、メタノールに一昼夜浸漬して、香気配糖体を抽出した。非天然型香気配糖体を内部標準として加え、減圧濃縮を行い、乾固物を得た。乾固物を超純水に溶解した後、固相抽出カラムを用いて、香気配糖体を精製した。香気配糖体が含まれる画分をフィルターを通過して、液体クロマトグラフ質量分析装置によって分析した。ターゲット化合物である各種香気配糖体は、本研究課題によって化学合成した。

(2) 香気成分の定量分析

植物サンプルを液体窒素で凍結破碎した後、ジエチルエーテル:ヘキサン=1:1の有機溶媒に浸漬して、香気成分を抽出した。エチルデカノートを内部標準として加えた。固相カラムを用いて色素体などを除去し、窒素気流下で濃縮した。ガスクロマトグラフ質量分析装置によって分析した。入手可能なターゲット化合物は購入し、入手困難な化合物は、既存のGCMS分析データベースを用いることにより、化合物同定を行った。

(3) 大腸菌異種発現システムを用いた配糖化酵素の機能解析

公開ゲノムデータベースや in-house の次世代シーケンスデータを用いて、研究代表者らが発見した香気配糖化酵素のアミノ酸配列を鋳型として揮発性化合物の配糖化酵素を探索・選抜した。その結果、バラ、チャ、サツマイモ、などから複数の候補遺伝子を得た。全長 cDNA 配列をクローニングして大腸菌発現用ベクター pET に導入して、配糖化酵素発現プラスミドを構築した。配糖化酵素発現プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) RIPL に形質転換し、イソプロピル -D- チオガラクトピラノシドを添加してタンパク質発現を誘導した後、一昼夜培養を行った。培養した大腸菌を集菌後、アフィニティークロマトグラフィーによって目的タンパク質を生成して、異種発現香気配糖化酵素を調製した。糖供与体として UDP 糖を、糖受容体として香気成分および調製した異種発現香気配糖化酵素を用いて、酵素活性試験を行った。酵素反応代謝物を液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) を用いて、酵素反応代謝物の化学構造を解析した。

(4) 香気成分の抗菌活性

各種病原菌を培養した後、香気成分を培養液に添加して、病原菌の生育速度を解析することにより、各種病原菌に対する香気成分の抗菌活性を調査した。

4. 研究成果

上記の実験について、バラ、サツマイモ、チャについて実施した。ここではサツマイモに関する成果について報告する。サツマイモ根塊を6区画に分けて、それぞれの香気配糖体の定性・定量分析を行った。その結果、地下部の塊根上皮において、香気二糖配糖体リナリル - プリメベロシドを検出した。また、ゲラニル - プリメベロシドやネリル - グルコシドも検出した。一方、サツマイモ根塊部分において揮発性化合物が微量または未検出であったことから、

サツマイモにおいて揮発性化合物は香気配糖体として貯蔵されていることを明らかにした。サツマイモにおける香気配糖化メカニズムを明らかにするために、香気単糖配糖化酵素の単離・同定を行った。サツマイモ cDNA ライブラリーを用いて、遺伝子のスクリーニングを行った結果、複数の香気配糖化酵素の候補遺伝子を得た。これらを用いて大腸菌異種発現系により香気配糖化酵素を調製し、酵素活性試験を行い、LC-MS により酵素代謝産物の化学構造を解析した。糖受容体活性試験の基質としては、リナロール、ゲラニオール、ネロール、シトロネロール、 α -テルピネオール、芳香族アルコールであるオイゲノール、ベンジルアルコール、2-フェニルエタノール、脂肪族アルコールである (Z)-3-ヘキセノール、色素であるシアニジンの計 10 種類を用いた。また糖供与体活性試験の基質としては UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-キシロース、UDP-グルクロン酸、UDP-L-アラビノース、UDP-D-アラビノースの計 6 種の UDP 糖を用いた。その結果、糖受容体としてネロール、シトロネロール、ゲラニオール、 α -テルピネオール、2-フェニルエタノール、ベンジルアルコールなどを代謝した。また糖供与体は UDP-グルコース、UDP-ガラクトースなどに対して高い活性を示した。サツマイモ由来香気配糖体は主に、ネロール、シトロネロール、ゲラニオールなど、糖供与体として UDP-グルコースを基質とする配糖化酵素であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hamachi Ashita, Nisihara Masahiro, Saito Shiori, Rim Hojun, Takahashi Hideyuki, Islam Monirul, Uemura Takuya, Ohnishi Toshiyuki, Ozawa Rika, Maffei Massimo E., Arimura Gen-ichiro	4. 巻 249
2. 論文標題 Overexpression of geraniol synthase induces heat stress susceptibility in <i>Nicotiana tabacum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 235 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00425-018-3054-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tanaka Toshiyuki, Ikeda Ayana, Shiojiri Kaori, Ozawa Rika, Shiki Kazumi, Nagai-Kunihiro Naoko, Fujita Kenya, Sugimoto Koichi, Yamato Katsuyuki T., Dohra Hideo, Ohnishi Toshiyuki, Koeduka Takao, Matsui Kenji	4. 巻 178
2. 論文標題 Identification of a Hexenal Reductase That Modulates the Composition of Green Leaf Volatiles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 552 ~ 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1104/pp.18.00632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui Kenji, Takemoto Hiroyuki, Koeduka Takao, Ohnishi Toshiyuki	4. 巻 66
2. 論文標題 1-Octen-3-ol Is Formed from Its Glycoside during Processing of Soybean [<i>Glycine max</i> (L.) Merr.] Seeds	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 7409 ~ 7416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.8b01950	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yazaki K, Arimura GI, Ohnishi T.	4. 巻 58
2. 論文標題 Their Biosynthesis, Localization and Ecological Roles.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1615-1621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcx123.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota T, Ohnishi T, Shibata K, Asahina M, Nomura T, Fujita T, Ishizaki K, Kohchi T.	4. 巻 136
2. 論文標題 Occurrence of brassinosteroids in non-flowering land plants, liverwort, moss, lycophyte and fern.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 46-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2016.12.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 大西利幸
2. 発表標題 なぜ植物は良い香りがするのだろうか? ~植物の生存競争に大事な香り~
3. 学会等名 静岡大学グリーンサイエンスカフェ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西利幸
2. 発表標題 植物の生長や化学防御に寄与する二次代謝産物の生合成研究
3. 学会等名 第35回日本植物細胞分子生物学会 (さいたま) 大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koujirou Totsuka, Naoya Sakai, Tsuyoshi Katsuno, Naoharu Watanabe, Toshiyuki Ohnishi
2. 発表標題 Volatile C13-norisoprenoid and monoterpene alcohols contribute sweet muscatel-like scent in Oolong tea "Oriental Beauty" manufactured by <i>Camellia sinensis</i> in response to attacks by insect herbivores
3. 学会等名 The 13th International Meeting on Biosynthesis, Function and Synthetic Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiyuki Ohnishi
2. 発表標題 Study on plant terpene volatile biosynthesis
3. 学会等名 2nd German-Japanese Research Symposiumat Technische Universitat Braunschweig (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水谷 正治、大西 利幸	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 328
3. 書名 基礎から学ぶ植物代謝生化学 (第7, 8, 10章)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	佐藤 浩平 (Sato Kouhei) (30756705)	静岡大学・工学部・助教 (13801)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------