

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780032

研究課題名(和文) 香気成分合成を制御する糖代謝遺伝子の同定とその機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis and identification of glucose metabolism genes that control the scent component synthesis

研究代表者

岸本 久太郎 (Kishimoto, Kyutaro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・花き研究所花き研究領域・主任研究員

研究者番号：60546737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：花冠から発散される香り(揮発性芳香族化合物)の生合成を制御すると推定されるグルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ、と6-ホスホグルコノラクトナーゼの遺伝子、およびその発散の昼夜律動性を制御すると推定されるbeta-フルクトフラノシダーゼとヘキソキナーゼ/グルコキナーゼの遺伝子をペチュニア花冠から単離した。

研究成果の概要(英文)：Two beta-fructofuranosidase genes and a hexokinase/glucokinase gene, which were expected to control the rhythm of the floral scent emission, and a 6-phosphogluconolactonase gene and a glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase gene, which were expected to contribute the biosynthesis of the floral scent were isolated from petunia corolla.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花 香り 香気成分 ペチュニア 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

ペチュニア (*P. axillaris*) の花の香気成分である揮発性芳香族化合物は花冠で作られ、その発散量には、夜間に最大値を示し、日中に最小値を示す昼夜律動性がある。メタボロミクスによって、花冠内の代謝物量の経時的な変化が計測された結果、揮発性芳香族化合物の内生量だけでなく、その前駆体であるフェニルプロパノイド、シキミ酸経路代謝物、解糖系代謝物、およびペントースリン酸経路代謝物の内生量もまた、香気成分の発散量と同調的に増減していることが明らかとなった。一方、香気成分とその前駆体の根源的な基質である糖の含量は、常に一定量が豊富に蓄積されていた。そして、香気成分やその前駆体量の昼夜律動性は、糖のリン酸化化合物であるグルコース-6-リン酸の増減によって生じていることが示された。これは、糖のリン酸化過程とその近傍の糖代謝を触媒している酵素の働きが、香気成分の生合成の主要な律速になっていることを示唆している。

また、*P. axillaris* には、揮発性芳香族化合物発散量が普通系統よりも非常に少ない微香性の系統が存在する。花冠におけるメタボロミクスの比較解析から、微香性系統では、ペントースリン酸経路におけるグルコース-6-リン酸から 6-ホスホグルコン酸へといたる酸化反応と加水分解反応によって触媒される過程のいずれか、あるいは両方が不活化しており、その結果、揮発性芳香族化合物生産量が著しく減少している可能性が示された。従って、これらの代謝過程を担うグルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼと 6-ホスホグルコノラクトナーゼは、花冠における揮発性芳香族化合物生産のために重要な役割を担っている可能性が高い。

これまで、香気成分生合成を触媒する酵素遺伝子を過剰発現させるか、それらの前駆体の生合成経路であるフェニルプロパノイド生合成経路を一括して正に制御する転写因子の過剰発現によって、香気成分発散量を人為的に増加させる試みが行われてきた。しかし、こうした遺伝子工学的手法によって花の香気成分生合成量が画期的に増加した例は知られていない。メタボロミクスの結果が示唆したように、香気成分生合成が、糖代謝（一次代謝）の過程で制御されていると見なすと、香気成分生合成経路において糖代謝過程より下流の生合成経路のみを改変した従来の香気成分生合成増加の試みは、不十分だったと考えられる。

香気成分生合成の律速となっている糖代謝酵素遺伝子を同定し、その発現様式を改変することによって、花の香気成分発散量を増加させたり、香気成分発散量が最大値を示す時間帯を変えたりすることが可能になると予想される。

2. 研究の目的

P. axillaris の花において香気成分発散の昼夜律動性を制御していると考えられる一次代謝経路の酵素遺伝子や微香性系統において香気成分生合成能の低下の原因となっている遺伝子を特定する。これらの遺伝子の花冠における発現様式の変化が、花の香気成分発散量やその律動性に影響を与えるか調査し、*P. axillaris* の香気成分発散の昼夜律動性を制御している遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

P. axillaris を 12 時間毎の明期と暗期を繰り返した条件で生育させ、花冠からの香気成分発散が暗期の中間地点に最大値を示す律動性となるように調節する。*P. axillaris* 花冠から得られた 4 万個の expressed sequence tag (EST) 特異的なプローブを配置したマイクロアレイを作製する。本アレイと開花 1 日後の *P. axillaris* 花冠から 2 日間にわたって 4 時間ごとに採取した RNA を用いてトランスクリプトームを行い、花冠における揮発性芳香族化合物生合成関連遺伝子の経時的な発現様式を網羅的に解析し、揮発性芳香族化合物発散の昼夜律動性と同調的な発現様式を示す遺伝子を検索する。既報のメタボロミクスの結果と照合し、揮発性芳香族化合物発散の律動性を制御している可能性の高い酵素遺伝子を単離して、従来と発現様式が異なるプロモーター制御下において *P. axillaris* に再導入する。組換え *P. axillaris* において、香気成分発散量やその律動性が変化するか確認する。

4. 研究成果

P. axillaris 花冠におけるトランスクリプトームの結果、揮発性芳香族化合物の生合成酵素遺伝子の発現量は、揮発性芳香族化合物の発散量が最も低い値を示す日中に最大値を示し、香気成分発散量と反対称の律動性を示した (図)。また、*P. hybrida* において揮発性芳香族化合物の生合成を正に制御しているとされる R2R3-MYB 転写因子の *EMISSION OF BENZENOIDS II (EOBI)* もこれらの遺伝子と同様の発現様式を示した。これらの結果から、*P. axillaris* の香気成分発散の律動性は、これらの遺伝子の発現によって生じているとは考えにくい。

揮発性芳香族化合物の前駆体であるフェニルプロパノイドの生合成酵素遺伝子は、発現量が暗期開始点に最大値を示す発現様式を示した (図)。フェニルプロパノイドの前駆体を生合成するシキミ酸経路とペントースリン酸経路における多くの酵素遺伝子も暗期開始点に最大値を示す発現様式を示した (図)。*P. hybrida* において揮発性芳香族化合物の生合成を正に制御しているとされる R2R3-MYB 転写因子の *ODORANT1* もこれらの遺伝子発現と同様の発現様式を示した。暗期開始点 (18:00) は、揮発性芳香族化合物の発散が最大値を示す時間 (0:00) と約 6 時間も差があることから、これらの遺伝子発現によって *P.*

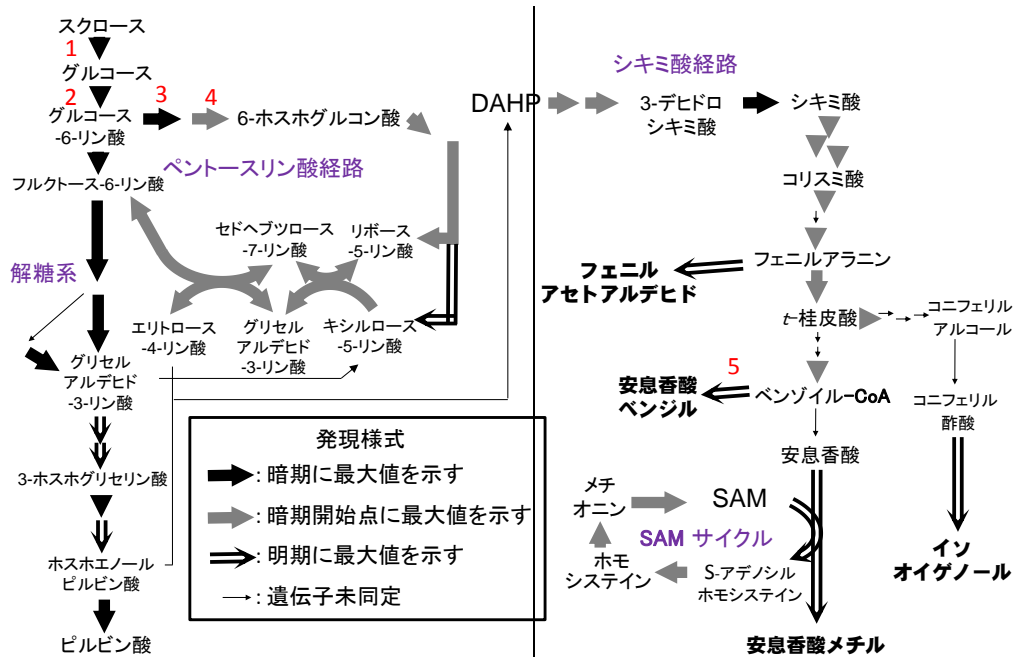


図 *P. axillaris*における揮発性芳香族化合物生合成関連遺伝子の発現様式

太字は香気成分(揮発性芳香族化合物); DAHP, 3-デオキシ-D-arabino-ヘプツロン酸7-リン酸; SAM, S-アデノシルメチオニン

axillaris の香気成分発散の律動性が生じる可能性は低いと考える。

シキミ酸生合成を触媒する酵素とペントースリン酸経路の開始点を触媒するグルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼの遺伝子発現は、夜間に最大値を示し(図)、揮発性芳香族化合物の発散様式と一致した。また、糖代謝および解糖系の酵素遺伝子は、スクロースから、グリセルアルデヒド-3-リン酸にいたる代謝過程の酵素遺伝子の発現様式が、暗期に最大値を示し(図)、揮発性芳香族化合物の律動性と似た様式を示した。これらの遺伝子の発現様式が、*P. axillaris* の香気成分発散の律動性を生み出している可能性が高い。しかし、発現の律動性の強弱には個々の遺伝子によって差があり、変動幅の低い遺伝子も多かった。これらの中から、香気成分発散の律動性に強く寄与していると考えられる遺伝子を既報のメタボロミクスの結果と照合して選定した。

メタボロミクスの結果では、グルコース-6-リン酸の増減によって、揮発性芳香族化合物とその生合成へ至る過程の前駆対含量の昼夜律動性が生じていることが示されており、微香性系統では、ペントースリン酸経路の開始点が失活することによって、香気成分生合成能が低下していることが示唆されている。トランスクリプトームの結果、グルコースからグルコース-6-リン酸を生合成する過程を触媒するヘキソキナーゼ/グルコキナーゼ(図の代謝過程 2)とその前段階を触媒するβ-フルクトフラノシダーゼ(図の代謝過程 1)をコードする遺伝子の中に、夜間に発現量が最大値を示し、発現に明確な昼夜律動性を有する遺伝子が見つかった。また、ペントースリン酸経路の開始点を触媒するグルコース-6-リン酸

1-デヒドロゲナーゼ(図の代謝過程 3)をコードする遺伝子の中にも同様な発現様式を示す遺伝子が見つかった。

これらの遺伝子とペントースリン酸経路の第二段階を触媒する 6-ホスホグルコノラクトナーゼ(図の代謝過程 4)をコードする遺伝子の cDNA を単離した。本遺伝子のクローニングの過程で、既報の EST 情報から 5'側の未知配列を同定するために用いた試薬が機能しておらず、クローニングが上手くいかない原因の同定に 1 年かかり、実験の進行が遅れた。最終的に香気成分発散の律動性と同調的な発現様式を示すβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子(2種類)、ヘキソキナーゼ/グルコキナーゼ遺伝子、グルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ遺伝子、6-ホスホグルコノラクトナーゼ遺伝子の cDNA の完全長をクローニングした。

これらの遺伝子が、*P. axillaris* の花冠において香気成分発散の昼夜律動性を制御していることを確認するために、花冠において本来の発現様式と異なる発現様式で発現させ、その変化が、香気成分発散の律動性にどのような影響を与えるか調査する必要がある。*P. axillaris* の花冠におけるトランスクリプトームの結果、ベンゾイル-CoA から安息香酸ベンジルの生合成を触媒するベンゾイル-CoA ベンゾイルトランスフェラーゼ(図の代謝過程 5)をコードする遺伝子の発現が顕著な昼夜律動性を示し、その発現量は日中に最大値を示した。加えて、本遺伝子は、葉や茎などの栄養器官では発現せず、花冠特異的に発現が認められた。本遺伝子のプロモーターは、特定の遺伝子に花冠特異的で、かつ日中に発現量が最大値を示す律動性を付与するために適していると考えられる。そこで、*P. axillaris* から

抽出した DNA を用いて、ベンゾイル-CoA ベンゾイルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域に相当すると考えられる開始コドンより上流の約 2 kb の未知塩基配列を同定した。

本研究では、これらの遺伝子を *P. axillaris* に再導入し、香気成分発散への影響を確認する予定であったが、遺伝子のクローニングに時間を要したため、そこまでには至っていない。現在、単離した酵素遺伝子を従来と発現様式が異なるプロモーター制御下において *P. axillaris* に再導入する準備を進めている。

—まとめ—

本研究では、*P. axillaris* において、花冠の香気成分の昼夜律動性を制御している可能性が高いβ-フルクトフラノシダーゼ遺伝子とヘキソキナーゼ/グルコキナーゼ遺伝子を単離・同定した。また、*P. axillaris* の微香性系統において、香気成分生合成能の低下の原因となっている可能性の高い グルコース-6-リン酸 1-デヒドロゲナーゼ遺伝子および 6-ホスホグルコノラクトナーゼ遺伝子を単離・同定した。これらの遺伝子を、*P. axillaris* に再導入し、香気成分発散量やその律動性への影響を確認する作業を継続中である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 1 件)

岸本久太郎、中山真義、安藤敏夫、大久保直美
「ペチュニア花冠の糖代謝遺伝子の発現は香気成分の昼夜リズムと同調的である。」
園芸学研究 10 巻別冊 2、285 頁
発表年月日 2011 年 9 月 25 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸本 久太郎 (KISHIMOTO, Kyutaro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構花き研究所花き研究領域・主任研究員
研究者番号：60546737