

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580162

研究課題名(和文) ペチュニア花香の多様性を制御する還元酵素の機能解析

研究課題名(英文) Biochemical characterization of reductases responsible for the formation of multiple floral scents in *Petunia*

研究代表者

肥塚 崇男 (Koeduka, Takao)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：30565106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではペチュニア花香の多様性に還元反応が関与していると考え、芳香族香気成分であるフェニルプロペン組成が異なるペチュニア品種におけるプロペン側鎖二重結合を還元する酵素の機能解析を行った。その結果、*Petunia axillaris* subsp. *parodii*から花芽特異的に発現し、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和二重結合を還元する全長cDNA配列の取得に成功した。

研究成果の概要(英文)：Given the chemical structures of phenylpropanoid volatiles such as dihydroconiferyl acetate, we assumed that the reduction of phenylpropanoids into dihydro derivatives must be catalyzed by double bond reductases in *Petunia axillaris* subsp. *parodii* unlike other *petunia* species. In this study, we investigated the double bond reductases that are responsible for the branching of the biosynthetic pathway of phenylpropanoid volatiles in *petunia* flowers.

研究分野：植物生化学

キーワード：植物二次代謝 香気成分 ペチュニア 還元酵素

### 1. 研究開始当初の背景

C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>を基本骨格とするフェニルプロパノイド系香気物質は、顕花植物から放散される特徴的な香りであり、南米原産のペチュニアではイソオイゲノールを含むフェニルプロパノイド類が主要香気物質として知られている。そして、このペチュニア属では明暗リズムによる香気物質の日周性制御によって、夜行性の蛾を受粉媒介者として誘引するなど極めて高度な共生機構を進化させてきた。このように、植物香気物質は生態系の中で重要な生理的役割や機能を担っているものの、その生合成系に關与する酵素及びその遺伝子については未だ不明な点が多い。そのような中、著者らは先行研究において、フェニルプロパノイド系香気物質であるオイゲノール、イソオイゲノールを生成する酵素遺伝子を同定し、キノンメチド中間体を經由する新規酵素反応機構を明らかにした。そして、酵素の基質選択性にはフェノール性水酸基とプロペン側鎖二重結合が必須であることを証明した。

ジヒドロコニフェリルアセテートを生産する唯一のペチュニア品種 *Petunia axillaris* subsp. *parodii* では、*Petunia hybrida* や *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* と異なりイソオイゲノールが生合成されないことが報告されている。ジヒドロコニフェリルアセテートがイソオイゲノール前駆体の類縁化合物であることを考慮すると、キノンメチド中間体を形成するために必要なプロペン側鎖二重結合が生合成経路の上流で還元されたためイソオイゲノールが生成されないことが考えられた。本研究では、こうした研究背景を踏まえ、ペチュニア花香の多様性を引き起こす要因の一つとして、プロペン側鎖二重結合の還元反応に着目して研究に取り組んだ。

### 2. 研究の目的

香気成分組成の異なるペチュニアにおいて、フェニルプロパノイド系香気物質の多様性はプロペン側鎖二重結合の還元反応が重要であると考えられる。これまでに著者らはプロペン側鎖の還元反応を担う酵素として、ラズベリー香気物質の生合成に關与し、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル構造を認識する還元酵素 (RZS) の単離・同定に成功している。本研究では、キノンメチド中間体を介する反応機構に基づいた酵素化学的な知見をもとに、代謝化学レベルと遺伝子レベルの両方から香気物質生合成の分岐制御機構の解明を目的としており、従前未解明のプロペン側鎖二重結合を還元する酵素遺伝子 (DBR) を単離し、その酵素学的特性を精査する。さらに、ペチュニア花香の人為的制御を目指した代謝工学デザインを検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1)トレーサー実験による還元反応段階の推定

*Petunia axillaris* subsp. *parodii* では、*Petunia hybrida* や *Petunia axillaris* subsp. *axillaris* と異なりイソオイゲノールが生成されず、その代わりに前駆物質誘導体であるジヒドロコニフェリルアセテートが蓄積している。ジヒドロコニフェリルアセテートはイソオイゲノール前駆体の側鎖二重結合が単結合へと還元された構造をしている。この二者の化学構造類似性を考慮すると、*Petunia axillaris* subsp. *parodii* では、キノンメチド中間体の形成に必要なプロペン側鎖の二重結合を還元する経路が *Petunia hybrida* に比べ優位に活性化され、結果としてイソオイゲノールが生成されずジヒドロコニフェリルアセテートが蓄積していると予想された。そこで、重水素標識した前駆体 (クマル酸、フェルラ酸など) を用いたトレーサー実験により、生合成経路のどの反応段階で側鎖二重結合が還元されているかを明らかにする。

#### (2)プロペン側鎖二重結合を還元する酵素の単離・機能解析

申請者らは近年、ラズベリー果実の香気物質であるラズベリーケトンの生合成酵素 (RZS) を単離・同定することに成功している。このRZSは、側鎖の $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル二重結合を認識し、NADPHを補酵素として還元反応を触媒する。酵素反応機構を考慮すると本研究においても、RZSの同族還元酵素がジヒドロコニフェリルアセテートの生成に關与していると考えられた。そこで、RZSを含む二重結合還元酵素DBRファミリーの保存領域にアニールする縮重プライマーを用いたPCRクローニング、それに引き続くRACE (Rapid amplification of cDNA ends)-PCR法により、*Petunia axillaris* subsp. *parodii* からDBR候補遺伝子の単離を行う。本研究では、これら候補遺伝子の酵素活性を測定するために、大腸菌発現系で組換え酵素の発現を行う。また、各遺伝子の組織特異的発現解析を行い、ペチュニア花卉で高発現している遺伝子に注目し、ジヒドロコニフェリルアセテートの代謝変動プロファイルと連動している遺伝子を絞り込み、優先的に酵素活性測定に進める。この際、トレーサー実験の結果から予想される化合物を基質として、どのような化学構造を認識するか、特にプロペン側鎖やベンゼン環の官能基の違いに着目し、RZSの酵素学的特性と比較しつつ基質特異性・基質認識機構を精査する。

#### (3)還元酵素を過剰発現/抑制させた組換えペチュニアの作製

*Petunia axillaris* subsp. *parodii* と *Petunia hybrida* の香気物質生合成系の違いが、単離した還元酵素遺伝子に起因するかを *in vivo* で確認するため、本酵素遺伝子を導入した形質転換ペチュニアを作製し、香気物質組成の変化を調べる。そのために、まず形質転換に用いる発現ベクターの構築を行う。*Petunia hybrida* において

は、本酵素遺伝子を35Sプロモーター下で恒常的に過剰発現させ、イソオイゲノールの減少とジヒドロコニフェリルアセテートの増加の相関について定量分析する。また、*Petunia axillaris* subsp. *parodii*においては、本酵素遺伝子のRNA interference (RNAi)法による発現抑制を行い、コニフェリルアセテートもしくはイソオイゲノール(あるいはオイゲノール)が生成されるかを確認する。

#### 4. 研究成果

まず、ジヒドロコニフェリルアセテートの生合成経路の解明および生成経路のどの段階でプロペン側鎖二重結合の還元反応が起こるのかを調べるため、*Petunia axillaris* subsp. *parodii*の花弁にジヒドロコニフェリルアセテート前駆体を投与するフィーディングアッセイを行った。ジヒドロコニフェリルアセテート前駆体として、フェニルアラニン进行处理した場合、ジヒドロコニフェリルアセテートに加え、安息香酸ベンジルやサリチル酸ベンジル、フェニル酢酸ベンジルなどペチュニア花香で見られるほとんどのフェニルプロパノイド系香気物質が約 1.5-2 倍増加していた。このことから、ジヒドロコニフェリルアセテートは他のフェニルプロパノイド系香気物質と同様にフェニルアラニンを出発物質として生合成されることが考えられた。一方、還元反応が起こる段階を絞り込むために生合成中間体であるクマル酸进行处理した場合は、ジヒドロコニフェリルアセテートを含むほとんどのフェニルプロパノイド系香気物質が減少もしくは検出限界以下の生成量となっていた。この場合、クマル酸を溶解している 5%炭酸水素ナトリウムの影響によることが考えられた。現在、クマル酸のような水溶液に溶解しにくい生合成中間体进行处理の際、処理液に析出せず、フェニルプロパノイド系香気物質が十分量検出されるような条件検討を行いつつ、重水素標識化合物のトレーサー実験を進めている。

一方で、ジヒドロコニフェリルアセテートの生成に関与する還元酵素を取得するため、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル二重結合を還元する酵素 DBR ファミリーの保存領域にアニールする縮重プライマーを用いた PCR クローニングおよび RACE-PCR を行った。その結果、*Petunia axillaris* subsp. *parodii*の花弁から全長約 1kbp の長さを持つ 3 つの全長 cDNA 配列 (*PapDBR1*, *PapDBR2*, *PapDBR3*)の取得に成功した。これら 3 つの遺伝子は、ラズベリーの  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル二重結合還元酵素である RZS と 45-76%のアミノ酸相同性を示した。次に、得られた遺伝子がジヒドロコニフェリルアセテートの生合成に関与するのかどうかを調べるため、組織別および開花ステージ別遺伝子発現解析を行ったところ、*PapDBR1* は花冠筒部 (tube)、花弁 (limb)、雌蕊 (pistil) で強く発現していた (図 1A)。さらに、開花別の発現解析では、*PapDBR1* は

開花前の蕾の段階から発現が始まり、開花後まで発現が上昇傾向にあることが明らかになった (図 1B)。このような花弁特異的発現は、ペチュニアで報告されている他のフェニルプロパノイド系香気物質生合成遺伝子 (*CFAT*, *IGS*, *BPBT*, *BSMT* など) の発現パターンと酷似していた。一方、*PapDBR2* と *PapDBR3* は、葉 (leaf)、茎 (stem)、萼片 (sepal)、雄蕊 (stamen) を含む全ての組織および開花ステージで発現が確認された。ペチュニアでは、ジヒドロコニフェリルアセテートを含むほとんどの香気物質が花芽特異的に生合成されること、開花後に香気物質の増加が報告されていることから、*PapDBR1* の遺伝子発現パターンが代謝物レベルでの生成量と一致しており、*PapDBR1* がジヒドロコニフェリルアセテートの生成に寄与している可能性が高いことが考えられた。

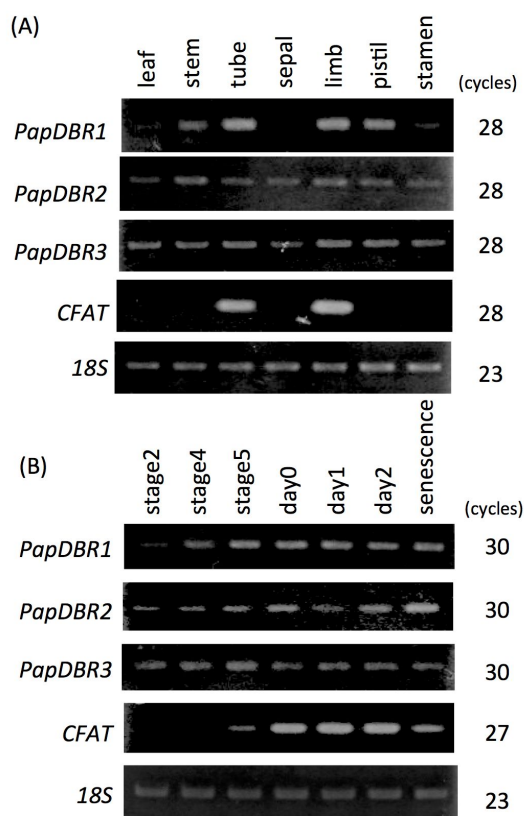


図1. 還元酵素遺伝子*PapDBR*の遺伝子発現解析

一方で、得られた 3 つの *PapDBR* の還元活性を測定するため、大腸菌発現系を用いた異種発現により組換え酵素を調製した。pET28aベクターにクローニングした後、Rosetta2(DE3)pLysS を発現宿主として組換え酵素を発現させたところ、*PapDBR1*, *PapDBR2*, *PapDBR3* いずれの酵素においてもアミノ酸配列から予測された約 40 kDa のタンパク質の発現が SDS-PAGE によって確認された。そこで、ジヒドロコニフェリルアセテートの生合成経路上に位置し、分子内に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル二重結合を有する化合物として、クマリルアルデヒドやコニフェリルアルデヒドを基質として各 *PapDBR* と反応

させた。その結果、PapDBR1 と PapDBR3 はコニフェリルアルデヒドに高い活性を示し、クマリルアルデヒドにはほとんど反応しなかった。一方、PapDBR2 はクマリルアルデヒドとコニフェリルアルデヒドの両方を良い基質とした。また、プロペン側鎖の鎖長が異なるデヒドロラズベリーケトンおよびデヒドロジンゲロンを反応させたところ、PapDBR1 と PapDBR2 において顕著な還元活性が見出された。しなしながら、いずれの酵素においてもアルコール誘導体では還元活性は見られなかった。このことは、PapDBR1 と PapDBR2 がプロペン側鎖の鎖長に対して比較的かさ張る化合物も基質として認識することを示唆している。PapDBR が、 $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル二重結合を特異的に認識することから、ジヒドロコニフェリルアセテートの生合成の中間体でありプロペン側鎖の鎖長が比較的長いクマリル CoA やフェルロイル CoA なども基質となりうる可能性が示唆され、in vivo ではアルデヒドもしくは CoA 誘導体の段階で還元反応が進んでいると考えられた。一方、PapDBR の発現を抑制させた組換えペチュニアについては、現在も進行中である。

#### 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 6 件)

Koeduka T., Sugimoto K., Watanabe B., Kawanishi D., Gotoh T., Ozawa R., Takabayashi J., Matsui K., Hiratake J., Bioactivity of natural *O*-prenylated phenylpropenes from *Illicium anisatum* leaves and their derivatives against spider mites and fungal pathogens. *Plant Biology*, 16: 451-456 (2014) (査読有)

Karamat F., Olry A., Munakata R., Koeduka T., Sugiyama A., Paris C., Hehn A., Bourgaud F., Yazaki K., A coumarin-specific prenyltransferase catalyze the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *Plant J.*, 77: 627-638 (2014) (査読有)

Koeduka T., The phenylpropene synthase pathway and its applications in the engineering of volatile phenylpropanoids in plants. *Plant Biotech.*, 31: 401-407 (2014) (査読有)

Suzuki S., Koeduka T., Sugiyama A., Yazaki K., Umezawa T., Microbial production of plant specialized metabolites. *Plant Biotech.*, 31: 465-482 (2014) (査読有)

Iijima Y., Koeduka T., Suzuki H., Kubota K., Biosynthesis of geraniol, a potent aroma compound in ginger rhizome (*Zingiber officinale*): Molecular cloning and characterization of geraniol dehydrogenase.

*Plant Biotech.*, 31: 525-534 (2014) (査読有)

Koeduka T., Suzuki S., Iijima Y., Ohnishi T., Suzuki H., Watanabe B., Shibata D., Umezawa T., Pichersky E., Hiratake J., Enhancement of production of eugenol and its glycosides in transgenic plants via genetic engineering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 436: 73-78 (2013) (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

藤田芳勸、飯島陽子、鈴木秀幸、松井健二、肥塚崇男、サンショウ葉の香気成分とセスキテルペン合成酵素に関する研究、日本農芸化学会中四国支部第41回講演会、2015年1月24日、水産大学校(山口県・下関市)

棟方涼介、Karamat Fazeelat, Alexandre Olry, 肥塚崇男、杉山暁史、Cedric Paris, Alain Hehn, Frederic Bourgaud, 矢崎一史、フラノクマリン生合成初発反応を担うクマリン特異的プレニル基転移酵素の解析、日本農芸化学会2014年度大会、2014年3月27日、明治大学(神奈川県・川崎市)

肥塚崇男、石崎公庸、河内孝之、松井健二、苔類ゼニゴケにおけるオキシリピン代謝酵素CYP74ファミリー酵素遺伝子の機能解析、第55回植物生理学会、2014年3月18日、富山大学(富山県・富山市)

Koeduka T., Hiratake J., Matsui K., Specialized metabolites and biochemical characterization of double bond reductase in *Marchantia polymorpha* L., Marchantia Workshop 2012, 2012年11月15日~2012年11月17日、ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本県・阿蘇郡)

〔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〕

なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥塚 崇男 (KOEZUKA TAKAO)

山口大学・農学部・助教

研究者番号：30565106

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし