

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350118

研究課題名(和文) マツタケの香りを特徴づける香気成分桂皮酸メチルの生合成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the biosynthetic mechanism of the characteristic aroma component methyl cinnamate in *Tricholoma matsutake*

研究代表者

田崎 裕二 (TASAKI, YUJI)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号：90390434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：保存によるマツタケの香り消失と桂皮酸メチル生合成機構の解明を研究目的とした。マツタケの子実体と菌糸体でのフェニルアラニンアンモニアラーゼ(PAL)活性、PAL遺伝子(TmPAL1とTmPAL2)発現と桂皮酸メチルとの関係を調べた。PAL活性、TmPAL2発現量と桂皮酸メチルは、子実体のひだで最も多かった。また、Phe添加培地で培養した菌糸体では、PAL活性、TmPAL2発現量と桂皮酸メチル量の増加が見られた。これらの結果より、TmPAL2が主に桂皮酸メチルの生合成に関与していると考えられた。また、4℃で6日間保存した子実体のPAL活性と桂皮酸メチル量は、保存による顕著な影響は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the loss of Matsutake mushroom aroma due to storage and biosynthetic mechanism of methyl cinnamate in *Tricholoma matsutake*. In the fruiting bodies and mycelia of *T. matsutake*, we examined the relationship among phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, two PAL gene (TmPAL1 and TmPAL2) expression, and methyl cinnamate content. PAL activity, TmPAL2 expression level, and methyl cinnamate content were highest in the gills of the fruiting bodies. Further, when the mycelia were cultured in media supplemented with Phe, PAL activity, TmPAL2 expression level, and methyl cinnamate content increased. These results suggest that TmPAL2 is involved mainly in the biosynthesis of methyl cinnamate. In addition, PAL activity and methyl cinnamate content were examined in the fruiting bodies that were stored for 6 days at 4°C, but the significant effect due to storage was not observed.

研究分野：食品生化学

キーワード：キノコ マツタケ 香気成分 桂皮酸メチル 遺伝子 フェニルアラニンアンモニアラーゼ 生合成
機構 子実体

1. 研究開始当初の背景

近年、日本人における肥満・糖尿病・高血圧などの生活習慣病が増加している。その要因の一つが食生活の欧米化である。そして、これらの疾患は、発症の低年齢化や人口の高齢化に伴い、今後ますます増加すると予測される。

キノコは、血糖値降下作用、抗高血圧作用などの疾患予防と治療効果をもち、低カロリーであるため、生活習慣病の予防に有効な食材である。しかし、最近のキノコの消費量は横ばい状態である。また、 α -グルカンのような薬効成分が明らかにされる一方で、食品として不可欠な“おいしさ”を追求する研究はあまりみられない。そこで、申請者はキノコの消費拡大のためにはおいしさの向上が不可欠だと考え、その香りに着目した。

「香りマツタケ、味シメジ」と昔から言われるように、キノコの香りの代名詞はマツタケである。しかし、マツタケは人工栽培ができず、収穫量も減少しているため、国産マツタケは大変高値である。また、近年外国から大量のマツタケが輸入され、比較的低価格で販売されている。しかし、長距離移動により収穫後長時間を経た外国産は、国産ものに比べ香りが少なくなっている。この品質低下を防ぐためには、輸送（保存）期間中に香りを安定的に維持することが必要となる。

キノコの消費拡大の一環として新品種キノコの開発は盛んに行われている。その結果、味、香り、食感などに特徴をもつ多くのキノコの人工栽培が可能となり、季節に関係なく食卓に並ぶようになった。しかし、日本人にとってマツタケに勝るキノコは未だ存在しない。よって、マツタケの香気成分の生合成を人工栽培が可能で制御できれば、マツタケ風味の新品種キノコの作出が可能となり、キノコをおいしく、たくさん食べてもらうことにつながる。

マツタケの主な香気成分は1 オクテン 3 オールと桂皮酸メチルである。1 オクテン 3 オールはほとんどのキノコに存在する香気成分である。一方、桂皮酸メチルは、他のキノコにはあまり存在しないが、マツタケには多量に存在する。そして日本人が好むマツタケの香りを特徴づけているのは桂皮酸メチルであり、1 オクテン 3 オールは香り全体に深みを与えていると言われている。しかし、マツタケ全体の香りに及ぼす香気成分別の寄与度は調べられていない。よって、マツタケの香りの生成・消失機構の詳細は不明である。桂皮酸メチルの生合成に関する知見は、マツタケではないが、バジル等の香草植物で報告がある。その生合成経路 (Plant Cell, 19, 3212, 2007) から推定すると、マツタケの桂皮酸メチルは L-フェニルアラニン (Phe) から、Phe アンモニリアーゼ (PAL) と桂皮酸カルボキシメチルトランスフェラーゼ (CCMT) の酵素触媒を経て合成される。

1 オクテン 3 オールの生合成は、リノール

酸からリポキシゲナーゼ (LOX) の酵素触媒により開始する経路が提唱されている。申請者らは、初めてキノコ (ヒラタケ) から LOX を精製し、その酵素化学的性質から 13-ヒドロペルオキシリノール酸 (HPOD) を経た経路を推定した (J. Agric. Food Chem., 50, 1247, 2002)。また、ヒラタケ LOX 遺伝子の単離にも成功している (Biosci. Biotechnol. Biochem., 77: 38, 2013)。

さらに、リノール酸を添加した培地で発生したヒラタケ子実体では、1 オクテン 3 オール合成量と LOX 活性が増大することを明らかにした。これより、キノコにおいて、基質や酵素活性化剤・安定化剤の添加という培養環境の制御により香気成分量を制御できると考えられる。よって、1 オクテン 3 オールと桂皮酸メチルの両生合成経路をもつキノコを用いて、深みある本物に近いマツタケの香りをもつ新品種キノコの作出が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、マツタケの子実体及び菌糸体における桂皮酸メチル生合成酵素の活性とそれに対応する遺伝子の発現と桂皮酸メチル量の関係を調べた。これにより、マツタケの香りの消失における桂皮酸メチルの寄与と、桂皮酸メチルの生合成機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マツタケ子実体サンプル

マツタケ子実体の各部位における実験には、長野産、岩手産、中国雲南省産の子実体を傘、ひだ、柄、石づきに分けて使用した。子実体の各生長過程における実験には、ころ、小つぼみ、中つぼみ、開き小、開き大の長野産マツタケを使用した。子実体の保存における実験には、長野産子実体を 0, 3, 6 日間 4 で保存した後、傘、ひだ、柄の各部位に分けて使用した。

(2) マツタケ菌糸体の培養条件と Phe 添加

菌糸体は、NBRC 30605 株を用いた。菌糸体は、寺下ら (日本菌学会会報, 32: 477, 1991) が使用した液体培地で、20 で 90 日間静置培養した。また、Phe を 45 日目に終濃度 0.5 ~ 6.0 mM になるように添加した後、15 日間培養した。

(3) マツタケ粗抽出液の調製, PAL 活性, 桂皮酸メチルの定量

粗抽出液の調製は、田崎ら (Biosci. Biotechnol. Biochem., 77: 38, 2013) の方法で行った。PAL の活性測定は、分光光度計を用いて、Zimmermann と Hahlbrock (Arch. Biochem. Biophys., 166: 54, 1975) の方法で行った。桂皮酸メチルはガスクロマトグラフィを用いて、寺下ら (日本菌学会会報, 32: 477, 1991) の方法で行った。

(4) PAL の cDNA とゲノム DNA のクローニング

植物・菌類の PAL で保存されるアミノ酸配列を基に、作製した縮重プライマーとマツタケ菌糸体のトータル RNA を用いて RT-PCR を行い、得られた産物の DNA 配列を解読した。その後、RACE 法により完全長の cDNA を取得した。PAL 遺伝子のゲノム DNA は、PCR 法により増幅した後、DNA 配列を解読した。

(5) PAL 遺伝子の転写量測定

PAL 遺伝子の転写量は、リアルタイム RT-PCR 法で測定した PAL の DNA 配列を基に、特異的なプライマーを作成して使用した。測定試料には、子実体の各部位(傘、ひだ、柄、石づき)、子実体の各生長過程、4 で保存した子実体及び Phe 添加の培地で培養した菌糸体を使用した。

(6) 組換え PAL タンパク質の産出と精製

マツタケの 2 つの PAL 遺伝子 (TmPAL1 と TmPAL2) の cDNA を RT-PCR により合成した後、大腸菌発現系 pET28 または pET32 ベクターに連結し、組換え PAL タンパク質を産出した。その後、His タグを用いたアフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーで、組換えタンパク質を精製した。

(7) TmPAL2 の組換えタンパク質の酵素化学的性質

精製した組換えタンパク質 TmPAL2 を用いて、基質特異性、最適 pH 等の酵素化学的諸性質を調べた。

4. 研究成果

(1) マツタケ子実体における PAL 活性と桂皮酸メチル量

マツタケ子実体(長野産、岩手産、中国雲南省産)の各部位(傘、ひだ、柄、石づき)における PAL 活性と桂皮酸メチル量の関係を調べた。その結果、長野産、岩手産、中国雲南省産の子実体全てにおいて、ひだで PAL 活性と桂皮酸メチル含量が高く、続いて傘、柄、石づきの順であり、PAL 活性と桂皮酸メチル量の間に関連関係が見出された。

次に、長野産マツタケ子実体の生長過程(ころ、小つぼみ、中つぼみ、開き小、開き大)における PAL 活性と桂皮酸メチル量の関係を調べた。PAL 活性は小つぼみ、開き小、開き大において、高い傾向にあり、桂皮酸メチル含量は開き小と開き大で高かった。これより、PAL 活性と桂皮酸メチル量の間に関連関係は見出せなかった。

長野産マツタケ子実体を 4 で保存(0.3, 6 日間)した後、傘、ひだ、柄の各部位における PAL 活性と桂皮酸メチル量の関係を調べた。PAL 活性と桂皮酸メチル量は、保存による顕著な影響は見られなかった。しかし、桂皮酸メチルと同時に測定できるマツタケの

もう一つの主な香気成分 1-オクテン-3-オール量は、全ての部位において、保存により減少した。これより、保存によるマツタケの香りの減少・消失には、桂皮酸メチルより 1-オクテン-3-オールの方が大きく関与していると考えられた。

(2) Phe 添加によるマツタケ菌糸体の PAL 活性と桂皮酸メチル量の影響

マツタケ菌糸体を液体培地で静置培養し、最大生長が 60 日目である生長曲線を作成した。次に、培養途中に Phe を添加した菌糸体の PAL 活性と桂皮酸メチル量を測定した。その結果、PAL 活性と桂皮酸メチル量は共に増加した。これより、Phe が桂皮酸メチルの材料であると考えられた。

(3) PAL 遺伝子の構造

マツタケ PAL をコードする 2 つの遺伝子 (TmPAL1 と TmPAL2) の cDNA 及びゲノム DNA を各種 PCR 法で増幅した後、それらの DNA 配列を決定した。TmPAL1 と TmPAL2 には、それぞれ 7 と 11 のイントロンが存在していた。また、TmPAL1 と TmPAL2 は 744 と 718 のアミノ酸から構成されるタンパク質をコードし、それらには PAL 活性部位の保存配列が存在していた。

(4) PAL 遺伝子の転写量測定

TmPAL1 と TmPAL2 のマツタケ子実体(長野産、岩手産、中国産)の各部位(傘、ひだ、柄、石づき)における発現様式を調べた。その結果、TmPAL1 は石づきと柄において高い発現量を示したのに対して、TmPAL2 はひだと傘において高い発現量を示した。また、産地の違いによる発現量の違いは若干見られたが、発現様式は類似していた。これらの結果より、産地の違いに関わらずマツタケ子実体において、TmPAL1 と TmPAL2 は異なる機能を果たしている可能性が見出された。

次に、TmPAL1 と TmPAL2 の生長過程における発現様式を調べた。TmPAL1 の発現量は、開き小で低かったが、その他ではほぼ一定であった。一方、TmPAL2 の発現量は、ころから開き小までほぼ一定であったが、開き大で増加した。これらの結果からも、TmPAL1 と TmPAL2 は子実体中で異なる機能を果たしている可能性が見出された。

Phe を添加した培地で培養したマツタケ菌糸体における、TmPAL1 と TmPAL2 の発現を調べた。その結果、TmPAL1 にあまり変化が見られなかったのに対して、TmPAL2 の発現量は増加した。これまでの子実体と菌糸体における PAL 遺伝子の発現解析の結果より、TmPAL2 が主に桂皮酸メチルの生合成に関与していると考えられた。

(5) 組換え PAL タンパク質の産出と精製

TmPAL1 と TmPAL2 の cDNA から大腸菌発現系を用いて活性を有する組換え PAL タンパク質

(TmPAL1 と TmPAL2) を産出した。TmPAL1 においては、精製の条件を検討中であり、TmPAL2 においては、精製が成功した。

(6) 組換え PAL タンパク質の酵素化学的性質

TmPAL2 において、最適 pH は 8.5、最適温度は 45 だった。pH 安定性として、pH 5.0 ~ 11.0 の範囲で 80%以上の活性が維持された。温度安定性として、20 ~ 60 まで 90%の活性が維持された。また、TmPAL2 の Km は 2.03 mM、Vmax は 0.22 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{min}$ 、Kcat は $1.17 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、Kcat / Km は $578 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ だった。

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1件)

Yuji Tasaki, Hayato Miyakawa: 「Structure and expression of two phenylalanine ammonia-lyase genes of the basidiomycete mushroom *Tricholoma matsutake*」, Mycoscience 査読有 Vol. 56, No.5, 2015, pp. 503-511, doi: 10.1016/j.myc.2015.03.001

[学会発表](計8件)

Yuji Tasaki, Hayato Miyakawa, Shunya Hayashi: 「Cloning of two phenylalanine ammonia-lyase genes from *Tricholoma matsutake* and expression analysis in the fruiting body」, The 8th Meeting of Asia for Mushroom Science, pp. 63-64, 2015年10月22日, 米子コンベンションセンターBIG SHIP (鳥取・米子)

Yuji Tasaki, Hayato Miyakawa, and Shunya Hayashi: 「Expression analysis of two phenylalanine ammonia-lyase genes in *Matsutake* mushroom」, KAAB International Symposium 2015, P-8, 2015年9月29日, 新潟大学(新潟・新潟)

林駿治, 羽二生真弥, 大口かんな, 田崎裕二: 「マツタケ子実体形成過程におけるフェニルアラニンアンモニアラーゼの発現と桂皮酸メチルの生成」, 日本きのこ学会第19回大会, pp. 76, 2015年9月6日, つくば国際会議場(茨城・つくば)

太刀川智之, 宮川駿人, 田崎裕二: 「マツタケのフェニルアラニンアンモニアラーゼ(TmPAL2)の酵素化学的性質」, 日本きのこ学会第19回大会, pp. 75, 2015年9月5日, つくば国際会議場(茨城・つくば)

田崎裕二, 宮川駿人, 大口かんな, 羽二生真弥: 「マツタケのフェニルアラニンアンモニアラーゼ遺伝子の構造と発現」, 日本菌学会第59回大会, pp. 94, 2015年5月17日, 那覇市ぶんかテンプス館(沖縄・那覇)

田崎裕二, 宮川駿人, 勝田尚樹: 「マツタケ子実体におけるフェニルアラニンアンモ

ニアラーゼ遺伝子の発現と桂皮酸メチルの生成」, 日本きのこ学会第18回大会, pp. 137, 2014年9月12日, 京都大学(京都・京都)

宮川駿人, 勝田尚樹, 田崎裕二: 「マツタケのフェニルアラニンアンモニアラーゼ遺伝子の構造と機能の解析」, 第13回糸状菌分子生物学コンファレンス, pp. 67, 2013年11月21日, つくば国際会議場(茨城・つくば)

田崎裕二, 宮川駿人, 勝田尚樹: 「マツタケのフェニルアラニンアンモニアラーゼ遺伝子の構造」, 日本きのこ学会第17回大会, pp. 67, 2013年9月13日, 県立広島大学(広島・広島)

[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0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

田崎 裕二 (TASAKI, YUJI)

長岡工業高等専門学校・物質工学科・准教授

研究者番号: 90390434