

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870252

研究課題名(和文)植物ポテンシャルを利活用した新しい酵素機能同定法の構築

研究課題名(英文)New biochemical methods for plant enzymatic activity

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物に一過的に生合成候補酵素を過剰発現させ、植物自身に蓄積している代謝産物を基質とすることで、植物体内で酵素活性試験を行い、生成された代謝産物を化学分析することにより生合成酵素の機能を解明する。という手法の開発を目指した。その結果、チャ由来の1-デオキシ-D-キシロース-5-リン酸合成酵素遺伝子(DXS)とモノテルペン合成酵素遺伝子(TPS)を一過的に導入したタバコにおいて、モノテルペン内生量が著しく増加することを明らかにした。本方法は、基質の入手が難しい場合や、候補遺伝子のスクリーニングに効果を発揮する酵素機能同定法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：We constructed a new methods for biochemical identification of plant enzymes using *Nicotiana benthamiana* as heterologous expression platform. 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate gene and monoterpene synthases from *Camellia sinensis* installed in *Nicotiana benthamiana* gave higher amount of monoterpenoids rather than wild type *Nicotiana benthamiana*. This new methods would open the door to identification of plant terpene synthases without neither adding substrate candidates nor extracting enzymes.

研究分野：植物化学

キーワード：テルペン

1. 研究開始当初の背景

現在、100種類以上の植物から医薬品原料や機能性食品などの有用物質が生み出されており、植物は優れた天然物供給資源である。しかし、含量が乾燥重量の数パーセント程度と低いこと、栽培に長期間要すること、品質の不均一性などの課題がある。また植物を伐採して有用物質を取得するため資源保全や持続的供給の問題がある。現在、これら問題点を克服するため、Medicinal Plant Consortium (USA), Smart Cell (EU), PhytoMetaSyn (Canada) など大規模プロジェクトが進められている。これらプロジェクトの共通点は有用物質、特に医薬品を生合成する薬用植物のゲノム解読を行い、生合成遺伝子を微生物や植物に組み込むことで、有用物質を生物に生産させる試みである。実際、抗マラリア治療薬アルテミシンや抗がん作用化合物イソチオシアネートを植物を用いて生合成させる試みが始まっている。(Teun et al., Plos one, 5, e14222, 2010; Pfalz et al, Plant Cell, 23, 716-729, 2011)。しかし、有用物質生産システムには大量生産方法の検討など工業化に向けた課題や未知生合成酵素の機能解明など基礎レベルの課題も多い。

植物や微生物の二次代謝産物生合成に関与する酵素の機能解明は、大腸菌や酵母など異種発現系により組換え酵素を作製し、基質を加えて酵素活性を評価する *in vitro* 酵素試験が成果を上げてきた。しかし、植物由来生合成酵素の機能解明の際、*in vitro* 酵素試験には問題点もある。異種発現系のため、活性型酵素が得られないことがある。植物二次代謝産物の高度な多様性のため、正しい基質を見つけ出すことが困難である。基質を準備する必要がある。上記の問題点のため生合成酵素機能が未解明なままになっている植物由来有用物質は多

い。そこで我々は *in vitro* 酵素試験の問題点を克服した生合成酵素の機能解明手法が必須であると考え、「植物ポテンシャルを利活用した新しい酵素機能同定法の構築」を想起した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アグロバクテリウム注入法 (アグロ注入法) により有用物質の生合成候補遺伝子を導入した過剰発現タバコを作製し、その組換えタバコ自身が蓄積している代謝産物を基質として、植物体内で酵素活性試験を行わせ、組換えタバコが目的代謝産物を生成しているか否かの代謝産物解析または組換えタバコと非組換えタバコの代謝産物の量的解析を行うことで、生合成遺伝子の探索および同定する手法の構築である。

3. 研究の方法

(1) テルペン未知生合成遺伝子の探索に適した植物プラットフォーム (イソペンテニルニリン酸/ジメチルアリルピロリン酸 (IPP/DMAPP) の高蓄積組換えタバコ) を作製するため、テルペン生合成の出発物質であるイソペンテニルニリン酸/ジメチルアリルピロリン酸 (IPP/DMAPP) を高蓄積する代謝改変組換えタバコを一過的アグロバクテリウム発現方法を用いて作製に取り組んだ。

(2) 上記で作成した IPP/DMAPP の高蓄積組換えタバコを用いて、植物モノテルペンアルコール生合成酵素の機能解明を行った。

4. 研究成果

(1) チャ (*Camellia sinensis*) より、イソペンテニルニリン酸/ジメチルアリルピロリン酸 (IPP/DMAPP) 生合成遺伝子をクローニングし、既知のテルペン生合成酵素遺伝子と同時にタバコにインフィルトレーシ

オンを行い，生成したモノテルペン量を解析した。その結果，1-デオキシ-D-キシロコース-5-リン酸シンターゼ (DXS) を導入した組換えタバコにおいてモノテルペン生成量が最も多かった。

(2) 上記(1) により作製した DXS 過剰発現タバコを用いて，チャのトランスクリプトームデータから選抜したモノテルペン生合成遺伝子をアグロバクテリウム - 一過的発現法により導入して，植物体から香気成分を抽出し，GC-MS によって分析を行った。その結果，2 種のテルペン合成酵素の酵素代謝産物を明らかにした。また本酵素活性は大腸菌異種発現系で調製した酵素の機能と一致した。

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 2 件)

Cui J, Katsuno T, Totsuka K, Ohnishi T, Takemoto H, Mase N, Toda M, Narumi T, Sato K, Matsuo T, Mizutani K, Yang Z, Watanabe N, Tong H. Characteristic Fluctuations in Glycosidically Bound Volatiles during Tea Processing and Identification of Their Unstable Derivatives. *J Agric Food Chem.* 64, 1151-1157 (2016). (査読 有)

Ohgami S, Ono E, Horikawa M, Murata J, Totsuka K, Toyonaga H, Ohba Y, Dohra H, Asai T, Matsui K, Mizutani M, Watanabe N, Ohnishi T. Volatile Glycosylation in Tea Plants: Sequential Glycosylations for the Biosynthesis of Aroma -Primeverosides Are Catalyzed by Two *Camellia sinensis*

Glycosyltransferases. *Plant Physiol.*, 168, 464-477 (2015) (査読 有)

[学会発表] (計 5 件)

大西利幸 「お茶の香りの生成・貯蔵メカニズム ~ 「甘い」香り成分とその安定的な貯蔵の謎 ~ 」植物発生ロジックの多元的開拓 第 3 回メタボローム勉強会 (山形県・鶴岡市) 2016 年 2 月 13 日-15 日 (招待講演)

大西利幸 , 井上智宏 , 田中智己 「Agroinfiltration 法を用いたテルペン生合成酵素の同定法」植物化学調節学会第 50 回大会 (東京都・文京区) , 2015 年 10 月 23 日-25 日

井上智宏 , 渡邊修治 , 鈴木秀幸 , 大西利幸 「チャ香気に関与するテルペン生合成酵素の機能解明」植物化学調節学会第 50 回大会 (東京都・文京区) , 2015 年 10 月 23 日-25 日

大西利幸 「お茶の香りの貯蔵メカニズム ~ 香り成分の安定的な貯蔵の鍵を握る酵素遺伝子 ~ 」宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター 第 35 回 C-Bio セミナー (栃木県・宇都宮市) , 2015 年 10 月 13 日 (招待講演)

阪井直哉 , 戸塚紘二郎 , 勝野剛 , 春日久栄 , 川上幸宏 , 渡辺修治 , 大西利幸 「台湾烏龍茶・東方美人茶の香気寄与成分の同定」第 59 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (大阪府・東大阪市) , 2015 年 9 月 5 日-7 日

[図書] (計 1 件)

Plant Specialized Metabolism: Genomics, Biochemistry, and Biological Functions (Chapter 11 Volatile glycosylation—A story of glycosyltransferase for volatiles: Glycosylation determining the boundary

of volatile and nonvolatile specialized metabolites) (2016), 376 page

Eiichiro Ono and Toshiyuki Ohnishi

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

<http://www.grl.shizuoka.ac.jp/~t-oonishi/>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し