

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380024

研究課題名(和文)芳香性花卉の非メバロン酸経路を介する香り発散特性の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism of the emission of flower volatiles synthesized through non-mevalonic acid pathway

研究代表者

土井 元章(Doi, Motoaki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40164090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：花卉の香り育種に有用な知見を得るため、バラを用いて以下の実験を行った。芳香性品種の花弁からは、モノテルペノイド、セスキテルペノイド、芳香族アルコール、酢酸エステル、ジメトキシトルエンが検出された。また、これらのバラ切り花の香りには鎮静効果と精神的疲労低減効果が認められた。モノテルペノイド合成酵素遺伝子として2遺伝子がクローニングされた。このうちRhMTS2は被子植物の非環式モノテルペノイド合成酵素遺伝子群に分類され、芳香性品種のかたい蕾で高発現していた。ゲラニルニリン酸合成酵素としては、RhGPPS-LSU1、RhGPPS1が単離でき、前者は芳香性品種すべてと非芳香性の1品種で高発現していた。

研究成果の概要(英文)：To obtain knowledge useful for the breeding of fragrant flowers, following experiments were conducted using cut roses. Emission of monoterpenes including citronellol, nerol and geraniol, sesquiterpenes, aromatic alcohols, acetate esters and 3,5-dimethoxytoluene were detected. The scent of these cut roses showed a sedative effect and decreased mental fatigue. In addition to these, two monoterpene synthases, RhMTS1 and RhMTS2, were cloned. The RhMTS2 are grouped into a cluster consisting of acyclic monoterpene synthases of angiosperms and highly expressed in petals of tight buds of scented cultivars. On the other hand, two GPPS genes, RhGPPS-LSU1 and RhGPPS1, were cloned. The expression level of RhGPPS-LSU1 in petals of all scented cultivars and one non-scented cultivar was high.

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：園芸学 花卉 香り モノテルペノイド 生理・心理的效果 非メバロン酸経路 モノテルペノイド合成酵素
ゲラニルニリン酸合成酵素

1. 研究開始当初の背景

花卉の香りは、重要な品質構成要素であるが、成分組成や代謝経路の複雑さが原因で、あまり研究が進んでいない。そのような中であって、本研究で取り上げたバラについては、香気成分の特性から7通りの分類が行われている(蓬田, 2004)。しかし、切り花用のバラ品種の多くは非芳香性で、今後香りの質や量を改変し花の芳香を高めることは、新たな価値を付与する上で重要である。

我々は、園芸学の視点からこれまでシュッコンカスミソウを材料に花卉の悪臭とその改変に関する研究に取り組み、その賦香・変香技術を明らかにしてきた(Doi ら, 2008; Nimitkeatkai ら, 2005; 2006)。一方、フリージアでは、リナロール主体の香りとそのいくつかの異なるモノテルペノイドが組み合わさった場合で芳香の特性が異なり、後者がより好ましい香りになることを示した(Wongchaochant ら, 2005)。ヒトに好ましく感じられる香りの香気組成は複雑であり、いわゆる「フローラル」な花の好ましい香りには、リナロール等のモノテルペノイドが香気成分として関わっている。したがって、花卉の香りの育種を行う場合、モノテルペノイドの生合成と発散を制御するという視点が不可欠である。

植物から発散される種々のモノテルペノイドは、ゲラニルニリン酸から生合成され、表皮細胞のプラスチドが合成の場である。プラスチドでは、細胞質のメバロン酸経路とは異なり、ローマー(メチルエリトリトール)経路を経てゲラニルニリン酸が生合成される(Lichtenthaler ら, 1997)。近年 Kuzuyama らによってこの経路の全容解明と関連酵素、遺伝子の取得が進められた。一方、Pichersky ら(1995)によってリナロール合成酵素遺伝子(LIS)が単離されたことを皮切りに、オシメン合成酵素(OCS)やミルセン合成酵素(MYS)の遺伝子がキンギョソウから単離された(Dudareva ら, 2003)。また、レモンバジルからは鎖状モノテルペノイド合成の出発点となるゲラニオール合成酵素遺伝子(GES)が単離された(Iijima ら, 2004)。このようにモノテルペノイドの生合成に関して、本研究の開始時点でその分子機構を解明する素地が整ったといえる。

2. 研究の目的

本研究では、園芸学の視点に立って、バラをはじめとする主要花卉の香り組成の違いや香気発散の器官や時間的差異を解明し、香

りの育種に有用な知見を得ようとした、また、生理・生化学的な香りの制御手法の開発が望まれていることから、その基盤となるモノテルペノイドの合成経路の制御について検討するとともに、モノテルペノイド合成酵素遺伝子ならびに前駆物質であるゲラニルニリン酸(GPP)合成酵素遺伝子(GPPS)の探索と発現解析を行った。以下(1)~(4)はその具体的な目的である。

(1)バラの非芳香性および芳香性品種を実験材料として、香りの発散特性や発散部位を明らかにした。

(2)ヒトにバラの香りを嗅がせた場合の心理的・生理的な影響を評価し、心地よい香りを構成する香り組成を明らかにした。心理への影響はPOMS(profile of mood states)、生理への影響は心拍変動パワースペクトルと唾液アマラーゼ量をもとに解析した。

(3)バラのモノテルペノイド合成酵素遺伝子をクローニングし、他種のモノテルペノイド合成酵素遺伝子との類似点を明らかにした。また、これらの遺伝子発現の品種間差異と香気組成との関係、ステージ別、器官・組織別の発現解析と香気発散との関係を解析した。

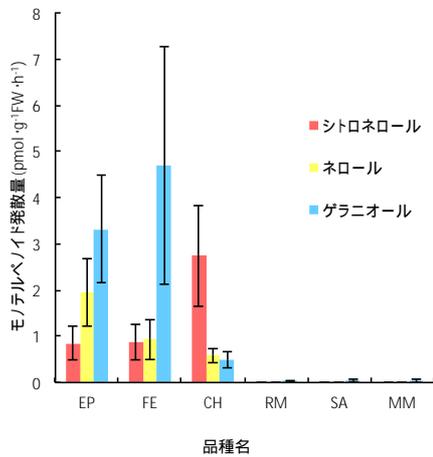
(4)モノテルペノイドの前駆物質となるゲラニルニリン酸の合成酵素の探索と発現解析を行った。

3. 研究の方法

(1)バラの香気成分特性 バラの切り花用品種、'イブカノン'、'イブピアッチェ'、'ウィッシング'、'グランドアモーレ'、'シェリル'、'スイートアバランチェ'、'チェラブカップ'、'パークアヴェニュープリンセス'、'ファンシーイブニング'、'フランソワ'、'プリンシパル'、'プリエ'、'マリアーナ'、'モナムール'、'リメンブランクス'を供試した。いずれも外花弁が展開した状態の開花花蕾を測定対象とした。

各品種1~2花をガラス製デシケーター中に封入した。活性炭およびMolecular Sieve 5A(粒度30-60)を通した空気(混合ガス)をデシケーターに送り、花序から発散されるヘッドスペース中の揮発性物質をTenax TA(粒度60-80, 500mg)カラムで2時間捕集した。揮発性物質を加熱導入装置により遊離させてGCに導入し、香気成分を分析した。

内生量の分析には、モノテルペノイド高発散(芳香性)品種の'イブピアッチェ'、'ファンシーイブニング'、'チェラブカップ'および低発散(非芳香性)品種の'リメンブランクス'、'スイートアバランチェ'、'モナムール'を供試した。午前11時に花弁がゆるんだ花蕾を収穫し、2~3枚の花弁を採取して試料とした。Oyama-Okubo ら(2005)の方法を一部改変し、ペンタンによる抽出を行った。



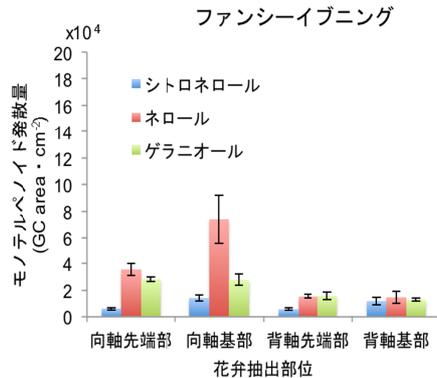
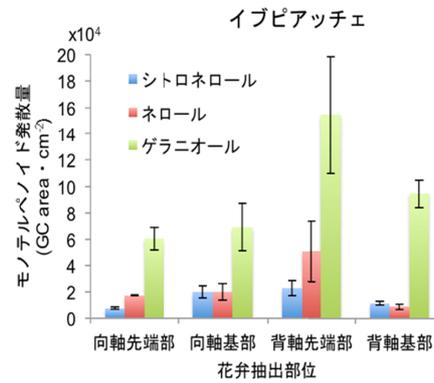
第2図 主要モノテルペノイドの品種別発散量
 平均値 ± 標準誤差 (n = 3)
 EP: イブピアッチェ FE: ファンシーイブニング
 CH: チェラブカップ RM: リメンブラン
 SA: スイートアバランチ MM: モナムール

らのモノテルペノイドの発散がほとんどみられない‘リメンブラン’、‘スイートアバランチ’、‘モナムール’を非芳香性品種として選び、以後の実験に供試した(第2図)。

ペンタン抽出法により葉、がく片、花弁中の内生量を調査したところ、花弁中の主要モノテルペノイドは、芳香性品種でいずれも多量に検出され、一方、非芳香性品種では‘リメンブラン’、‘モナムール’でゲラニオールがわずかに認められた以外、検出されなかった。また、芳香性品種の‘チェラブカップ’では、モノテルペノイドの内生量を花弁以外でも調査した結果、がく片および葉では検出されなかった。‘チェラブカップ’において、開花ステージ(1: がくが閉じた堅い蕾, 2: がくが開き始めた堅い蕾, 3: 花弁がゆるんだ開花花蕾, 4: 露芯した開花花蕾)別に主要モノテルペノイドの内生量を調査したところ、ステージ2からステージ3にかけて開花とともに蓄積することが明らかとなった。

芳香性品種の花弁で多量に検出されたシトロネロールおよびネロールはゲラニオールから異性化や還元などの化学反応を経て合成され、ゲラニオールは前駆物質のゲラニルニリン酸からゲラニオール合成酵素によって合成される。すなわち、バラの芳香品種では、シトロネロール、ネロール、ゲラニオールが花弁中に多量に存在することから、ゲラニオール合成酵素の活性が高く、花弁ではシトロネロールおよびネロールの前駆物質となるゲラニオールを多量に合成していると考えられた。

芳香性品種の‘イブピアッチェ’では向軸側、背軸側のいずれからも主要モノテルペノイドの発散量は多く、かつ組成は類似しており、ゲラニオールの発散量が多かった。また、‘ファンシーイブニング’では、向軸側のネロールの発散量が多かった(第3図)。なお、花弁表皮の走査型電子顕微鏡観察では、向軸側は釣鐘状細胞が並んでいたのに対し、背軸側は平板な細胞が並びそこにクチクラ

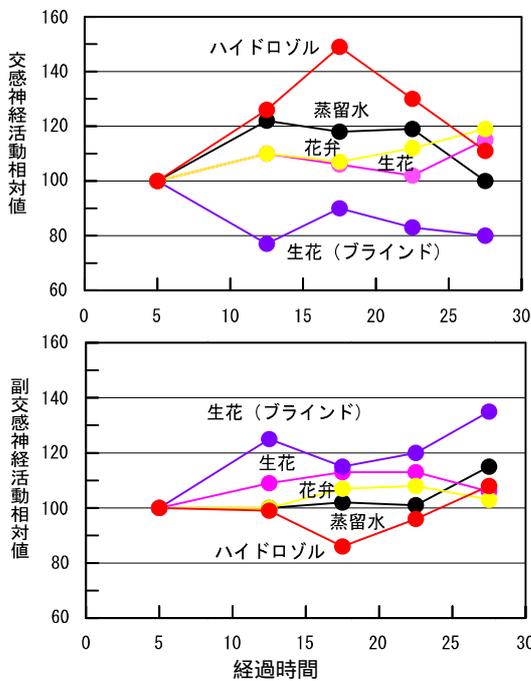


第3図 主要モノテルペノイドの花弁部位別発散量
 値は平均値 ± 標準誤差 (n=3)

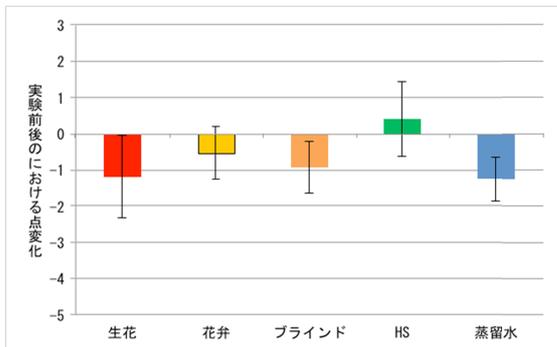
ワックスが全面に沈着していた。ただし、香気成分を蓄えるような細胞や構造物は向軸側、背軸側ともに観察されなかった。

(2)ヒトに対する香りの心理的・生理的影響の評価 ‘ウイシング’の生花や生花弁、ハイドロゾル(HS)を呈示した場合を例に結果を述べる。生花や生花弁の呈示直後から、交感神経活動の低減と副交感神経活動の亢進がみられ、鎮静効果を与えていることが示された(第4図)。また、生花および生花弁の呈示により、唾液アミラーゼ量が低下し、精神的疲労を低減することが示唆された。生花を濾紙で覆って見えなくして呈示した場合(ブラインド)でも、同様の効果が得られたことから、バラ生花のもつこれらの効果は視覚的なものではなく、主として香りに起因していると考えられた。

POMSでは、実験後得点から実験前得点を引いた、総合得点の変化を観察した。‘活気’の項目以外、負の値を示したとき、実験前より実験後の方が、気分状態が良好であることを示す。‘緊張-不安’についてみると、HSのみ得点の増加がみられた(第6図)。蒸留水と比較すると、生花とブラインドは総合得点に減少の差があまりみられなかったが、生花の呈示が最も緊張状態を抑制し、HSは緊張状態を促進したことから、HSの香気吸入には、生花とは異なり、興奮効果があることが示唆された。POMSによる気分状態の変化についての評価では、HSの呈示が‘混乱’の項目以外において、実験後に悪化していることが示された。したがって、HSは、気分状態の改善の



第 4 図 'ウイッシング' 生花, 花弁, ハイドロゾルを提示した際の交感神経および副交感神経活動の変化



第 5 図 実験前, 実験後の POMS における「緊張-不安」の総合得点変化 (実験後得点 - 実験前得点)

効果が得られにくいと考えられる。「緊張-不安」、「抑うつ-落ち込み」、「混乱」の気分状態を、生花が効果的に抑制し、気分状態の改善に有効である可能性が示された。

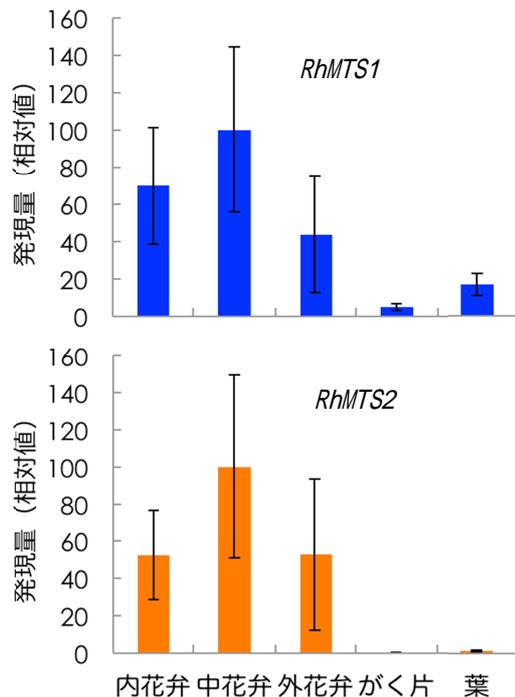
'イブピアッチェ'の生花と SH の主な香気成分はヘキサノール, 3-ヘキセノール, 3,5-ジメトキシトルエンであり, 全サンプルに共通して 2-フェニルエチルアルコールが含まれていた。また, HS では, シトロネロールやゲラニオールといったモノテルペノイドの比率が高く, 香気組成も単純であった。なお, 抽出物間では香気成分組成大きな品種間差異はみられなかった。

'イブピアッチェ'の生花, 花弁, 花弁(ブラインド)を提示したときの自律神経活動の結果は'ウイッシング'と同様であったが, HS の提示によっても交感神経活動が抑制, 副交感神経活動が亢進され, 鎮静効果が得られた。アブソリュート, アンフルラージュのサンプル提示によっても, 交感神経活動の低下, 経唾液アミラーゼ活性が低下した。POMS の総

合得点の変化からは, 生花の提示では気分状態が改善することが示された。また, バラ生花には, 抽出物より優れた心理効果がみられた。生花と抽出物では香気成分組成に違いがあり, バラの香気成分であっても組成や量の多少, 組み合わせによって生理・心理的影響は異なってくると考えられた。特に生花や生花弁では鎮静効果があるとされる 3,5-ジメトキシトルエンの発散が多く, 一方抽出物ではモノテルペノイドの含量が高いことが両者にこのような違いをもたらしたことが推察できる。

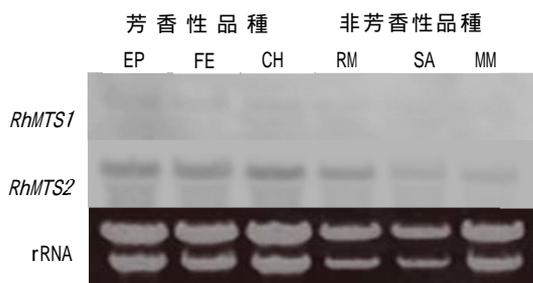
(3) モノテルペノイド合成酵素遺伝子の探索と発現解析 他の植物種のモノテルペノイド合成酵素遺伝子のアミノ酸配列をもとにディジェネレートプライマーを設計し, 2 種類の部分配列を単離した。これらを *RhMts1*, *RhMts2* として Race 法により全長を決定した。アミノ酸配列に基づいて系統樹を作成した結果, *RhMts1* は被子植物のモノテルペノイド合成酵素遺伝子群である Tps b グループに, *RhMts2* は被子植物の非環式構造のモノテルペノイド合成酵素遺伝子群である Tps g グループに分類された。なお, 後者に Tps g に分類される遺伝子の多くが花の香りに寄与していることが知られている。

芳香性品種の'チェラブカップ'を用い, *RhMts1* および *RhMts2* の開花ステージ別発現量をリアルタイム RT-PCR 法により調査した。その結果, 両遺伝子の発現はがく片が開きはじめた堅い蕾(ステージ 2)で最も高く, 開花とともに低下した。また, ステージ 2 において部位別の発現量を調査したところ, 両遺伝子とも花弁で発現が高く, がく片および葉で低かった(第 6 図)。さらに, 芳香性品種



第 6 図 'チェラブカップ'における *RhMts1* および *RhMts2* の器官別発現量

および非芳香性品種のステージ2の外花卉で品種別発現量を調査した結果、両遺伝子ともに芳香性品種と比較して非芳香性品種で発現量が低かった。ただし、ノーザン解析では、*RhMTS1*の発現は検出限界以下であった(第7図)。これらの結果からは、*RhMTS2*の発現がバラのモノテルペノイド合成に関わる可能性が示唆される。ただし、*RhMTS2*にはプラスチド移行シグナルがないなど、その機能に疑問な点も残された。

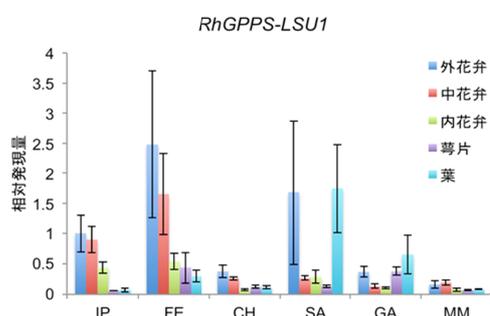


第7図 花卉における *RhMTS1* および *RhMTS2* の発現(ノーザンブロットイング)

EP: イブピアッチェ, FE: ファンシーイブニング, CH: チェラブカップ, RM: リメンブランズ, SA: スイートアバランチェ, MM: モナムール

(4)ゲラニルニリン酸合成酵素遺伝子の探索と発現解析 鎖状モノテルペノイド合成の前駆体となる GPP の合成に不可欠と考えられているゲラニルニリン酸合成酵素(GPPS)遺伝子を探索した。Maら(2012)によるとGPPSはSSU, LSUおよびGPPSの3つのクレードに分類される。これまでのところGPPS-SSUは単離できていないが、GPPS-LSUとGPPSについては‘ファンシーイブニング’を用いてクローンが得られ、Race法により全長配列を決定した(それぞれ *RhGPPS-LSU1*, *RhGPPS1* とする)。得られたアミノ酸配列をもとに系統樹を作成した結果、*RhGPPS-LSU1* は他種のGPPS-LSUの近傍に位置するゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素(GGPPS)のクラスターに、*RhGPPS1* は他種のGPPSが位置するクラスターに分類された。

芳香性および非芳香性各2品種を用いて *RhGPPS-LSU1* および *RhGPPS1* の器官別発現量



第8図 *RhGPPS-LSU1-1* の品種・器官別発現量。

EP: イブピアッチェ, FE: ファンシーイブニング, CH: チェラブカップ, SA: スイートアバランチェ, GA: グランドアモール, MM: モナムール

をリアルタイム RT-PCR により調査したところ、*RhGPPS-LSU1* は‘イブピアッチェ’や‘ファンシーイブニング’の中花卉や外花卉で高発現しており、‘スイートアバランチェ’の外花卉や葉でも高い発現がみられた(第8図)。一方、*RhGPPS1* の発現量には芳香性、非芳香性の品種間で大きな差はみられなかった。

引用文献

- Doi, M. et al. Acta Hort. 766: 493-499. (2008)
 Dudareva, N. et al. Plant Cell 15: 1227-1241. (2003)
 Iijima, Y. et al. Plant Physiol. 134: 370-379. (2004)
 Lichtenthaler, H. et al. Physiol. Plant. 101: 643-52. (1997)
 Ma, Y. et al. J. Exp. Bot. 63: 2809-2823. (2012)
 Nimitkeatkai, H. et al. Scientia Hort. 106: 370-380. (2005)
 Nimitkeatkai, H. et al. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 75: 148-153. (2006)
 Wongchaochant, S. et al. Acta Hort. 673: 596-601. (2005)
 Pichersky, E. et al. Arch. Biochem. Biophys. 316: 803-807. (1995)
 蓬田勝之. 2004. 香料 222: 129-140.

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 2 件)

土井元章・亀岡真帆・谷 一道・羽田野昌二. 2011. シュコンカスミソウ切り花の賦香・変香技術の開発. 園学研. 10(別1): 461.

富 研一・坂口絵理・上田早紀・林 孝洋. 2013. バラ‘ウイッシング’の生花およびハイドロゾルが人に与える生理・心理的影響. 園学研. 12(別2): 516.

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

土井 元章 (DOI, Motoaki)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 4 0 1 6 4 0 9 0

(2)研究分担者

林 孝洋 (HAYASHI, Takahiro)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号: 4 0 1 7 3 0 0 9

細川宗孝 (HOSOKAWA, Munetaka)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 4 0 3 0 1 2 4 6

水田洋一 (MIZUTA, Youichi)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 9 0 2 3 9 2 3 6

(平成 22 年度~24 年度)