

令和元年6月17日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00839

研究課題名(和文) マツタケの特徴的な香りの生合成遺伝子を単離してヒラタケに導入し、その香りを作る

研究課題名(英文) Isolation of the gene involved in biosynthesis of a characteristic aroma of matsutake mushroom and production of the aroma in oyster mushroom

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・教授

研究者番号：90390434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養中のマツタケ菌糸体に、桂皮酸メチル生合成酵素の基質となるPheと桂皮酸を供給することにより、菌糸体中の桂皮酸メチル量が増加した。また、Pheの供給により、Pheから桂皮酸を生成するPheアンモニアリアーゼ(PAL)活性とPAL遺伝子(TmPAL2)の発現量が増加した。一方、桂皮酸の供給により発現量が増加した遺伝子を、桂皮酸から桂皮酸メチルを生成する桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ(CCMT)の候補遺伝子として単離した。この候補遺伝子から組換えCCMTタンパク質を産出して、酵素活性を測定した。しかし、明確な活性を検出することはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでマツタケの特徴的な香り成分である桂皮酸メチルが、Pheより桂皮酸を経て生成されることが明らかにされていた。しかし、その生合成酵素に関する知見は乏しかった。本研究成果において、桂皮酸メチルの生合成には、主にTmPAL2が発現して生成されるPALが関与することが明らかにされた。また、それに続くCCMTをコードする遺伝子の単離を試みたが、その遺伝子の同定には至らなかった。しかし、この試みから、CCMTの活性測定法の再検討の必要性和CCMTとは異なる酵素が桂皮酸から桂皮酸メチルの生成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methyl cinnamate content in the mycelia of *Tricholoma matsutake* increased markedly in cultures supplemented with Phe and cinnamic acid, which are substrates for the methyl cinnamate biosynthetic enzyme. In addition, Phe supplementation increased Phe ammonia lyase (PAL) activity that produces cinnamic acid from Phe and transcript level of the PAL gene (TmPAL2). On the other hand, the gene whose expression level increased with cinnamic acid supplementation was selected as a candidate gene for cinnamic acid carboxymethyl transferase (CCMT), which produces methyl cinnamate from cinnamic acid. The recombinant CCMT protein was produced based on this candidate gene. CCMT activity of the recombinant protein was measured, but was not detected.

研究分野：食品生化学

キーワード：マツタケ 菌糸体 香氣成分 桂皮酸メチル 生合成酵素 フェニルアラニンアンモニアリアーゼ 桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ 遺伝子発現

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

キノコは血糖値降下作用等の機能性をもち、低カロリーであるため、肥満・糖尿病といった生活習慣病を予防・改善する食材である。しかし、最近のキノコの消費量は横ばい状態である。また、β-グルカンのような薬効成分が注目される一方で、おいしさを追求する研究はあまりみられない。そこで、申請者は生活習慣病の予防・改善にはキノコの消費拡大が一つの有効な方法と考え、さらに消費拡大にはおいしさの向上が不可欠であるため、その香りに着目した。

「香りマツタケ、味シメジ」というように、キノコの香りといえばマツタケである。しかし、人工栽培ができず、収穫量も減少しているため、国内産マツタケは大変高価である。現在、マツタケは外国から大量輸入され、比較的低価格で入手できる。しかし、長距離移動により収穫後長時間を経た外国産は、国内産に比べて香りが少ない。この品質低下を防ぐには、輸送・保存中に香りを安定的に維持する必要がある。

キノコの消費拡大の一環として、味・香り・食感等に特徴をもつ多くの新品種キノコが作出されている。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なキノコで制御できれば、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で検出される。一方、桂皮酸メチルは、キノコ類ではマツタケとバカマツタケなどでしか検出されない。そして、日本人が好むマツタケの香りの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。

桂皮酸メチルの生合成経路は、香草植物バジルで明らかにされている(図1)。服部ら(Mycoscience, 57:181, 2016)はトレーサー実験によりマツタケでPheから桂皮酸メチルが生合成されることを明らかにし、この経路の存在を証明した。研究代表者は、マツタケのPheアンモニアリアーゼ(PAL)の2つの遺伝子を単離し、マツタケ子実体における遺伝子の発現様式を明らかにした(Mycoscience, 56:503, 2015)。しかし、2つのPAL遺伝子の桂皮酸メチル生合成への関与については

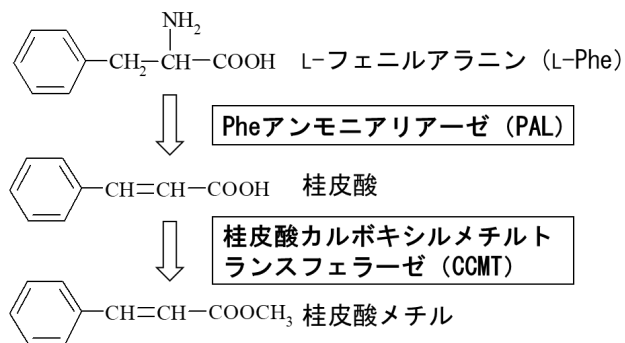


図1. 桂皮酸メチル生合成経路

調べられていなかった。さらに、桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ(CCMT)に関する知見はほとんどなかった。

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)とヒドロペルオキシドリアーゼ(HPL)の触媒により生合成される経路が提唱されている。研究代表者のグループはヒラタケLOXの酵素化学的性質を明らかにし(J Agric Food Chem, 50:1247, 2002)、そのLOX遺伝子の性質化に成功した(Biosci Biotechnol Biochem, 77:38, 2013)。しかし、HPLに関する知見はほとんどなく、生合成機構に関して不明な点も多く残されている。

### 2. 研究の目的

香りは食品の価値を決める重要な要素の一つである。食用キノコにおいては、マツタケの独特の香りが日本人にたいへん好まれている。その香りの主成分は桂皮酸メチルであるが、この成分がなぜマツタケとその近縁種のキノコでのみ検出されるかは分かっていない。

そこで、本研究では、マツタケの桂皮酸メチルの生合成機構を遺伝子レベル・タンパク質レベルで解明することを目的とし、マツタケの菌糸体における桂皮酸メチル生合成酵素(PAL)の活性とそれに対応する遺伝子の発現および桂皮酸メチル生合成量の関係を調べた。また、CCMT様の遺伝子を単離し、大腸菌発現系で組換えCCMTタンパク質を産出した後、その酵素化学的性質を調べた。

### 3. 研究の方法

#### (1) マツタケ菌糸体の培養条件と基質の添加

菌糸体(NBRC 30605株)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、培養45日目に桂皮酸メチル生合成酵素の基質となるPhe(終濃度0.5~6.0 mM)および桂皮酸(終濃度2.0 mM)を培地中に添加した後、さらに培養した。

#### (2) マツタケ菌糸体の粗抽出液の調製、酵素活性の測定、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の酵素活性は、分光光度計を用いてZimmermannとHahlbrock(Arch. Biochem. Biophys., 166:54, 1975)の方法で測定した。CCMTの酵素活性は、MTase-Glo Methyltransferase Assay(プロメガ社)を用いて測定した。桂皮酸メチルはガスクロマトグラフィーを用いて、寺下ら

(日本菌学会会報, 32: 477, 1991)の方法で定量した。

### (3) cDNA とゲノム DNA のクローニング

マツタケの公開ゲノム配列 (DOE Joint Genome Institute) を基に, 作製したプライマーとマツタケ菌系体のトータル 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。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。

### (4) リアルタイム RT-PCR による遺伝子の転写量測定

PAL および CCMT 様遺伝子の DNA 配列を基に, 特異的な一組のプライマーを作製して使用した。測定試料には, Phe または桂皮酸を添加して培養した菌系体から抽出したトータル RNA を使用した。リアルタイム RT-PCR 法は, 田崎ら (Mycoscience, 56: 503, 2015) の方法で行った。

### (5) 組換えタンパク質の産出

RT-PCR により合成した CCMT 様遺伝子の cDNA を pET28a 発現ベクターと連結した。これを大腸菌 DH5 に形質転換した後, 得られた組換えプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) に導入し, 形質転換体を得た。IPTG (0.4 mM) 添加後, 18 で約 18 時間培養して組換えタンパク質を誘導した。

## 4. 研究成果

### (1) 桂皮酸メチル生合成酵素の基質の添加によるマツタケ菌系体の酵素活性, 遺伝子発現および桂皮酸メチル量の影響

初めに, 培養途中に Phe を添加した菌系体の PAL 活性, PAL 遺伝子 (TmPAL1 と TmPAL2) の発現および桂皮酸メチル量を測定した。その結果, 添加 Phe 濃度 4~6 mM において, PAL 活性と桂皮酸メチル量は同様なパターンで顕著に増加した。これらの結果は, 添加した Phe が桂皮酸メチルの材料に使用されたこと, Phe により PAL が誘導され, 桂皮酸メチルの合成に関与し, 合成量が増加したことを示唆した。PAL 遺伝子の発現においては, TmPAL1 ではあまり変化が見られなかったのに対して, TmPAL2 では, PAL 活性と同様なパターンで増加した。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示唆された。

次に, もう一つの桂皮酸メチル生合成酵素の基質である桂皮酸を添加して培養した菌系体の桂皮酸メチル量を測定した。その結果, 桂皮酸 (濃度 2.0 mM) 添加後, 培養 2 日目において, 菌系体中の桂皮酸メチル量が 22 倍に増加した。これより, Phe と同様に, 添加した桂皮酸が桂皮酸メチルの材料に使用されたと考えられた。

### (2) CCMT 遺伝子の cDNA の単離と配列解析

(1) の結果より, 桂皮酸メチル生合成酵素の一つと考えられる CCMT 遺伝子も Phe 添加により発現量が増加すると予測された。そこで, Phe (終濃度 6 mM) 添加および無添加の培地で培養した菌系体よりトータル RNA を抽出し, それらを用いて各菌系体で発現する全 mRNA の配列解読 (次世代シーケンス RNA-Seq) を行った。Phe 添加で発現量の増加した遺伝子 cDNA の中に TmPAL2 遺伝子が含まれていることを確認した。しかし, CCMT 遺伝子に相当すると考えられる cDNA を確認することはできなかった。

そのため (1) の結果より, 桂皮酸の添加が桂皮酸メチルの生合成量を増加させたことから, それに関与する CCMT 遺伝子の発現量も増加すると考えられた。そこで, マツタケの公開ゲノム配列より, CCMT の候補となる 15 個のメチルトランスフェラーゼの遺伝子を選択した。桂皮酸添加及び無添加の培地で培養した菌系体のトータル RNA を用いて, リアルタイム RT-PCR で各遺伝子の発現量を調べた。その結果, 一つの遺伝子の発現量が桂皮酸の添加により約 4 倍増加したため, これを CCMT の候補遺伝子とした。そして, この候補遺伝子の cDNA とゲノム DNA をクローニングして, 配列を決定した。cDNA とゲノム DNA の配列を比較したところ, この遺伝子は 8 個のイントロンを含み, 487 個のアミノ酸からなる分子量約 54,000 のタンパク質をコードしていると推定された。また, このタンパク質にはクラス S-アデノシルメチオニン (SAM) - 依存性メチルトランスフェラーゼファミリーの保存配列が存在されていた。

### (3) 組換え CCMT タンパク質の産出と酵素化学的性質

CCMT 様候補遺伝子の cDNA と pET28a 発現ベクターを連結した組換えプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に導入し, 形質転換体を得た。その後, IPTG 誘導により, 目的の分子量約 55,000 の組換えタンパク質が生成されることを確認した。次に, 大腸菌粗酵素液を用いて, 組換えタンパク質の CCMT 活性を測定した。しかし, 明確な活性を検出することはできなかった。この結果より, この CCMT 様候補遺伝子が桂皮酸メチルの生合成に関与する CCMT 様遺伝子であることを明らかにすることはできなかった。また同時に, CCMT の活性測定法の再検討の必要性と CCMT とは異なる酵素が桂皮酸から桂皮酸メチルの生成に関与する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Yuji Tasaki, Shunya Hayashi, Miho Kato: 「L-Phenylalanine supplementation increases the

production of phenylalanine ammonia-lyase and methyl cinnamate in the mycelia of *Tricholoma matsutake*」, *Mycoscience* 査読有 Vol. 59, No.1, 2018, pp. 8-11, doi: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.07.001>

〔学会発表〕(計4件)

田崎裕二, 加藤美帆: 「マツタケ菌糸体における桂皮酸メチルの生成と桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ様遺伝子のクローニング」, 日本きのこ学会 第22回大会, p. 88, 2018年9月13日, 函館アリーナ(北海道・函館)

Miho Kato, Shunya Hayashi, Yuji Tasaki: 「Effect of L-phenylalanine supplementation on methyl cinnamate production and phenylalanine ammonia-lyase expression in the mycelium of *Tricholoma matsutake*」, The 9th Meeting of Asia for Mushroom Science, p. 55, 2017年10月27日, BAREVE Hotel(鳥取・米子)

林駿治, 布施佑梨穂, 田崎裕二: 「マツタケの菌糸体と低温保存した子実体におけるフェニルアラニンアンモニアリアーゼの発現と桂皮酸メチルの生成」, 日本きのこ学会 第20回大会, p. 40, 2016年9月8日, 静岡県男女共同参画センター(静岡・静岡)

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リアーゼ(TmPAL1)の酵素化学的性質」, 日本きのこ学会 第20回大会, p. 39, 2016年9月8日, 静岡県男女共同参画センター(静岡・静岡)

〔招待講演〕(計1件)

田崎裕二: 「マツタケの香気成分とその生合成機構」, 2018年度日本菌学会西日本支部大会, pp. 4-5, 2018年12月8日, 富山県民会館(富山・富山)

〔記事〕(計1件)

太刀川智之, 宮川駿人, 田崎裕二: 「日本きのこ学会第19回大会ポスター賞受賞者の紹介『マツタケのフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(TmPAL2)の酵素化学的性質』」, 日本きのこ学会ニュースレター, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://material.nagaoka-ct.ac.jp/staff/yuji-tasaki>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 宮川駿人

ローマ字氏名: Miyakawa Hayato

研究協力者氏名: 太刀川智之

ローマ字氏名: Tachikawa Tomoyuki

研究協力者氏名: 林駿治

ローマ字氏名: Hayashi Shunya

研究協力者氏名: 布施佑梨穂

ローマ字氏名: Fuse Yuriho

研究協力者氏名: 加藤美帆

ローマ字氏名: Kato Miho

研究協力者氏名: 古田島奈美

ローマ字氏名: Kotajima Nami

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。