

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02421

研究課題名(和文) マツタケの香りの生成と低減のメカニズムを解き明かす

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of production and reduction of characteristic aroma in matsutake 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マツタケの特徴香桂皮酸メチルと主要香気成分1オクテン3オールとの生合成機構を明らかにするため、それらの生合成に関わる遺伝子機能の解明を目的とした。桂皮酸メチルの生合成に関わる4つの桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ(CCMT)候補遺伝子のcDNAを用いて、組換え蛋白質を産出・精製し、生成物を解析した。しかし、桂皮酸メチルの生成は確認できなかった。1オクテン3オールの生合成に関わる3つのジオキシゲナーゼ(DOX)遺伝子の構造を配列解析により明らかにした後、3つのDOX遺伝子の組換え蛋白質を産出した。酵素活性と生成物の解析結果より、2つの組換え蛋白質がDOX活性を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マツタケの全体の香りに関わる1オクテン3オール生合成は、リノール酸より10-ヒドロペルオキシリノール酸を経て生成されることが明らかにされている。しかし、その生合成酵素に関する知見は乏しい。本研究成果において、1オクテン3オールの生合成に関わる酵素DOXの活性型組換えタンパク質の産出に成功した。今後、これらの組換えタンパク質の酵素化学的性質を明らかにすることにより、マツタケの1オクテン3オールの生合成機構の解明およびマツタケの全体の香りが収穫後に減少する要因の解明につながる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the biosynthetic mechanisms of methyl cinnamate, which is the characteristic aroma of matsutake mushroom, and 1-octen-3-ol, the major aromatic component, the purpose of this study was to elucidate the functions of the genes involved in their biosynthesis. Using the cDNA of four cinnamate carboxymethyltransferase (CCMT) candidate genes involved in methyl cinnamate biosynthesis, their recombinant proteins were produced and purified. The products formed by the purified recombinant proteins were analyzed. However, the formation of methyl cinnamate could not be detected. On the other hand, the cDNA and genomic DNA sequences of three dioxygenase (DOX) genes involved in the biosynthesis of 1-octen-3-ol were sequenced to reveal their gene structures. In addition, recombinant proteins of the three DOX genes were produced, and two of them had DOX activity from the analysis results of enzyme activity and formed products.

研究分野：応用微生物学

キーワード：マツタケ 香気生合成機構 桂皮酸メチル 1オクテン3オール 桂皮酸カルボキシルメチルトランスフェラーゼ ジオキシゲナーゼ 遺伝子発現 酵素化学的性質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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その近縁種のみで検出される。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。

香草バジルにおいて、桂皮酸メチルの生合成機構が解明された(図 1)。服部ら(Mycosci., 57, 181, 2016)はトレーサー実験により、マツタケでも Phe から桂皮酸メチルが生成されることを証明した。一方、我々はマツタケの 2 つの PAL 遺伝子の機能を解明した(Mycosci., 56, 503, 2015, Mycosci., 59, 8, 2018)。そして、マツタケの CCMT の機能が解明されれば、桂皮酸メチル生合成機構の全貌が明らかとなる。

マツタケは収穫後、香りが少なくなり品質が低下する。我々は収穫後に 4 保存したマツタケにおいて、桂皮酸メチルの量的変化はなく、1 オクテン 3 オールが減少することを見出した。これより、1 オクテン 3 オールの減少がマツタケの全体の香りの低減につながるということが分かった。キノコの 1 オクテン 3 オールはリノール酸から、リポキシゲナーゼ(LOX)とヒドロペルオキシドリアーゼ(HPL)またはジデオキシゲナーゼ(DOX)と HPL が関わる 2 つの経路で生成される。マツタケにおいては公開ゲノム配列に LOX

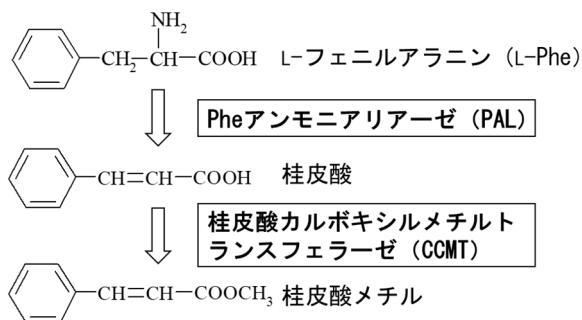


図 1. 桂皮酸メチル生合成経路

遺伝子がないため、DOX が関わる経路で生成されると考えられる。また、真菌 *Aspergillus* 属の DOX が DOX と HPL の両機能をもち、リノール酸から 1 オクテン 3 オールを生成することが報告された(Biochem. J., 425, 553, 2010)。これより、マツタケの 1 オクテン 3 オール生合成機構の全貌を明らかにするためには、DOX の機能の解明が重要となる。

### 2. 研究の目的

マツタケの特徴香である桂皮酸メチルは、マツタケとその近縁種のみで検出される。しかし、それ以外のキノコにも桂皮酸メチル生合成に関わる PAL とその基質(Phe)は存在する。そこで、マツタケとその近縁種のみで桂皮酸メチルが検出される要因を明らかにするため、マツタケの CCMT 遺伝子を単離し、その発現様式と酵素化学的性質を調べて、CCMT の機能を解明する。これにより桂皮酸メチル生合成機構の全貌を明らかにする。また、マツタケの全体の香りに関わる 1 オクテン 3 オールにおいて、収穫後に減少する理由を明らかにするため、1 オクテン 3 オール生合成への関与が推測される DOX 遺伝子の発現様式と酵素化学的性質を調べて、DOX の機能を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マツタケ菌糸体の培養とトータル RNA の抽出

マツタケの菌糸体(NBRC 30605 株)は、寺下ら(日菌報, 32: 477, 1991)の液体培地で、20 で 45 日間静置培養した。その後、桂皮酸メチル生合成酵素 CCMT の基質となる桂皮酸(終濃度 2.0 mM)を培地中に添加し、さらに 2 日間培養した。培養した菌糸体からのトータル RNA 抽出は、田崎ら(Mycosci., 56: 503, 2015)と同様に行った。

#### (2) CCMT 候補遺伝子の単離

桂皮酸(2 mM)添加及び無添加の培地で培養したマツタケ菌糸体からトータル RNA を抽出した。それらのトータル RNA を用いて、次世代シーケンス mRNA-Seq 解析(外部委託: 北海道システム・サイエンス)により全 mRNA の配列を解読した。桂皮酸添加の菌糸体において、無添加の菌糸体より mRNA 量が増加した遺伝子の中から、CCMT 候補遺伝子を選択した。

#### (3) cDNA とゲノム DNA のクローニング

CCMT 候補遺伝子の cDNA 配列を決定するため、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糸体のトータル RNA を用いて RT-PCR を行った。得られた PCR 産物をクローニングした後、DNA 配列を解読した(外部委託: 秋田県立大学)。また、RACE 法により完全長の cDNA を取得した後、同様な操作を行った。CCMT と DOX の遺伝子のゲノム DNA は、PCR 法により増幅し、得られた PCR 産物をクローニングした後、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

3 つの DOX 遺伝子の cDNA とゲノム DNA の配列を基に、特異的な一組ずつのプライマーを作製

した。測定試料には、マツタケ子実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 (Mycosci., 56:503, 2015) と同様に行った。

#### (5) 組換えタンパク質の産出と生成物の分析

RT-PCR により合成した 3 つの CCMT 候補遺伝子および 3 つの DOX 遺伝子の cDNA を発現ベクター (pET-28a) と連結した。これを大腸菌 DH5 に形質転換して組換えプラスミドを得た。CCMT 候補遺伝子においては、大腸菌 BL21(DE3) に導入し、形質転換体を得た後、IPTG (0.4 mM) 添加後、18 ℃ で 18 時間培養し、組換えタンパク質を誘導した。一方、DOX 遺伝子においては、組換えプラスミドを大腸菌 TOP10 に導入し、形質転換体を得た後、IPTG (0.1 mM) 添加後、15 ℃ で 3 日間培養し、組換えタンパク質を誘導した。

組換え CCMT 候補タンパク質を用いた桂皮酸からの生成物である桂皮酸メチルの分析は、GC と HPLC により実施した。組換え DOX タンパク質を用いたリノール酸からの生成物である 10-ヒドロペルオキシリノール酸の分析は、LC-MS を用いて分析した。

### 4. 研究成果

#### (1) CCMT 候補遺伝子の単離と cDNA 配列解析

CCMT の基質となる桂皮酸の添加及び無添加の培地で培養した菌糸体より抽出したトータル RNA を用いて、純度・断片サイズなどが良好なライブラリーを調製した。次世代シーケンス mRNA-Seq により各菌糸体で発現する全 mRNA の配列を解読した。それらの解析により、桂皮酸添加で発現量の増加する遺伝子 cDNA の中から CCMT の候補遺伝子を 3 つ選択した。それらの cDNA 配列を決定した。それらの cDNA 配列より、CCMT 候補遺伝子は、それぞれ 657, 359, 273 のアミノ酸から構成されるタンパク質をコードしていた。

#### (2) DOX 遺伝子の構造と推定タンパク質の配列解析

3 つの DOX 遺伝子 (*Tmdox1*, *Tmdox2*, *Tmdox3*) のゲノム DNA をクローニングして、ゲノム配列 (5,271 bp, 5,138 bp, 6,275 bp) を決定した。これらの配列と対応する cDNA 配列を比較することにより、それぞれ 24 個, 30 個, 33 個のイントロンを含むことが分かった。また、3 つの DOX 遺伝子は、それぞれ 1,110, 1,052, 1,284 のアミノ酸からなる比較的大きな分子量 (125 kDa, 117 kDa, 145 kDa) のタンパク質をコードしていた。それぞれの推定アミノ酸配列には、psi-producing Oxygenase A のモチーフが含まれ、これらがオキシゲナーゼをコードすると示唆された。

#### (3) DOX 遺伝子の転写量解析

3 つの DOX 遺伝子の転写量をリアルタイム PCR 法により解析するための準備を行った。試料として、マツタケ子実体の生長過程、各部位、収穫後保存した子実体および 1 オクテン 3 オールの材料となるリノール酸を供給したマツタケ菌糸体から抽出したトータル RNA より、cDNA を合成した。また、それぞれの遺伝子のプライマーを設計し、子実体 cDNA を用いてリアルタイム PCR を行い、非特異的な増幅がないことを確認した。

#### (4) 組換え CCMT タンパク質および組換え DOX タンパク質の産出と性質化

3 つの CCMT 候補遺伝子の cDNA を用いて、大腸菌発現系により組換えタンパク質を産出した。SDS-PAGE において、IPTG 誘導後のみに、各遺伝子がコードするタンパク質の推定分子量とほぼ同じ位置にタンパク質バンドが検出された。よって、目的の組換えタンパク質が産出されたと考えられた。各タンパク質を精製した後、基質の桂皮酸からの生成物を HPLC で解析したが、桂皮酸メチルの生成は確認できなかった。よって、これらのタンパク質は CCMT 活性を持たないと考えられた。

大腸菌発現系を用いて、3 つの DOX 遺伝子の組換えタンパク質 (*rTmDOX1*, *rTmDOX2*, *rTmDOX3*) を産出した。SDS-PAGE において、3 つの組換えタンパク質は、各遺伝子がコードするタンパク質の推定分子量とほぼ一致した。よって、目的の組換えタンパク質を産出できたと考えられた。リノール酸を基質として酸素電極法により組換えタンパク質における DOX 活性を測定した。その結果、*rTmDOX1* と *rTmDOX2* においては、差があるものの活性が検出された。しかし、*rTmDOX3* には活性は検出されなかった。よって、*rTmDOX3* は不活性型として産出されたと考えられた。活性型 *rTmDOX3* については、大腸菌の株の変更や酵母、糸状菌のような宿主に変更する必要があると考えられた。一方、いくつかの IPTG 誘導条件下で組換えタンパク質の誘導を試みたが、いずれも産出量が少なく、精製する上で必要とされるタンパク質量は得られなかった。そこで、今後は大腸菌の粗酵素液を使用して、*rTmDOX1* と *rTmDOX2* の酵素化学的性質を調べることにした。

これらの研究成果は、マツタケの 1 オクテン 3 オールの生合成に関わる DOX 遺伝子の機能解明およびマツタケの全体の香りが収穫後に減少する要因を解き明かす大きな手掛かりとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東はるか, 加藤美帆, 古田島奈美, 中野遥妃, 畑昂樹, 藤野愛花里, 品川朋弥, 田崎裕二
2. 発表標題 マツタケ由来の組換えジオキシゲナーゼの産出と性質
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東はるか, 藤野愛花里, 古田島奈美, 田崎裕二
2. 発表標題 マツタケのジオキシゲナーゼ遺伝子の配列解析と組換えタンパク質の産出
3. 学会等名 日本きのこ学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------