

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05836

研究課題名(和文)「香り」配糖体が司る開花制御メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the flowering control mechanism mediated by "aroma" glycosides

研究代表者

大西 利幸 (Ohnishi, Toshiyuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：60542165

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)：香気配糖体は、「香り」のただ単なる貯蔵化合物であると考えられてきた。最近、研究代表者は、香気配糖体が植物の開花を促進することを見出した。植物の生殖戦略である「開花」と花粉媒介者を誘引するための「香気の発散」は、全く別の事象としてこれまで考えられてきたが、研究代表者が得た知見は、香気配糖体が「開花」と花粉媒介者を誘引するための「香気の発散」を逐次的に制御するシグナル分子であることを強く示唆している。生殖イベントにおける香気配糖体の生理学的意義を分子レベル(生物有機化学的精密度)で解き明かすことで、植物の生殖戦略に関する新しい概念を提案することを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究課題の学術的意義は、「なぜ植物は香気配糖体を生合成し、貯蔵するのか？その生理学的意義は何か？」である。研究代表者は、植物の生殖イベントに注目し香気配糖体が「開花」と「香気の発散」を逐次的に制御するシグナル分子であることを実証し、植物の生殖システムを化学的側面から理解し深化させ、香気配糖体の生理学的意義を明らかにするブレイクスルーにしたい。

研究成果の概要(英文)：Aromatic glycosides have long been thought to be mere storage compounds of "fragrance". Recently, the principal investigator found that aromatic glycosides promote flowering in plants. Flowering, which is a reproductive strategy of plants, and the release of fragrance to attract pollinators have been considered to be completely different events, but the findings strongly suggest that aromatic glycosides are signaling molecules that sequentially regulate flowering and the release of fragrance to attract pollinators (Figure 1). The findings strongly suggest that aromatic glycosides are signaling molecules that sequentially regulate "flowering" and "scent release" to attract pollinators. By elucidating the physiological significance of aromatic glycosides in reproductive events at the molecular level (bioorganic chemical precision), we aimed to propose a new concept of plant reproductive strategy.

研究分野：植物化学

キーワード：配糖体 開花 揮発性有機化合物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、多種多様な揮発性有機化合物 (volatile organic compounds; VOCs) を発散し、植物間または他生物との情報伝達のための化学ツールとして利用している。特に、植物が、昆虫や鳥などの花粉媒介者が植物の花粉を運んで受粉させるためには、「開花」と「香りの発散」が逐次的に起こる必要がある。つまり、まず花弁が展開し、雄しべや雌しべが露出し、次に花弁から香気が発散して、花粉媒介者が花弁に誘引され、雄しべや雌しべに到達できて、受粉が成立する。「開花」と「香気」の順序が逆の場合、受粉は難しい。「開花」と「香気」のそれぞれの分子メカニズムは明らかになりつつある。しかし、植物が「開花」と「香気」の2つの生殖イベントを逐次的に制御する仕組みに関する知見はなく、またその分子メカニズムについては未解明のままある。

### 2. 研究の目的

本研究課題の目的は、植物の香気関連物質が生殖活動を制御するシグナル分子であると位置づけ、香気関連物質が「いつ」、「どこで」生成・分解されるのか? 「どのように」開花を促進するのか? を分子レベル (生物有機化学的精密度) で解き明かすことである。植物の生殖メカニズムを化学的に理解し、農作物生産の現場で応用・発展させていくためには、香気関連物質を分子レベルで明らかにすることが欠かせない。これまでに、研究代表者は「香り」の代謝・生合成に関する先駆的成果を挙げてきている。これらの成果を発展させ、植物の生殖戦略に関する新しい概念を打ち出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 香気関連物質の定量分析

植物サンプルを液体窒素で凍結破碎した後、メタノールに一昼夜浸漬して、香気配糖体を抽出した。非天然型香気配糖体を内部標準として加え、減圧濃縮を行い、乾固物を得た。乾固物を超純水に溶解した後、固相抽出カラムを用いて、香気配糖体を精製した。香気配糖体が含まれる画分をフィルターを過して、液体クロマトグラフ—質量分析装置によって分析した。ターゲット化合物である各種香気配糖体は、本研究課題によって化学合成した。

#### (2) 大腸菌異種発現システムを用いた香気関連物質の機能解析

ペチュニア花弁 200g を粗酵素抽出、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムを用いて、香気関連物質生成活性に基づいて、目的とする生合成酵素を精製した。精製酵素をペプチド解析するために、断片化した後、LC-MS/MS を用いてペプチド配列解析を行った。得られたペプチド配列を基にペチュニアの公開ゲノムデータベースや in-house の次世代シーケンスデータを用いて、香気関連物質を生成する生合成酵素の探索選抜を行った。その結果、ペチュニア花弁で顕著に発現している複数の候補遺伝子を得た。全長 cDNA 配列をクローニングして大腸菌発現用ベクター pET に導入して、異種発現用プラスミドを構築した。異種発現用プラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) RIPL に形質転換し、イソプロピル  $\beta$ -D-チオガラクトピラノシドを添加してタンパク質発現を誘導した後、一昼夜培養を行った。培養した大腸菌を集菌後、ヒスチジンタグアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって目的タンパク質を生成して、香気関連物質生合成酵素を調製し、酵素活性試験を行った。酵素反応代謝物を液体クロマトグラフ—質量分析計 (LC-MS) を用いて、酵素反応代謝物の化学構造を解析した。

#### (4) 香気成分の抗菌活性

各種病原菌を培養した後、香気成分を培養液に添加して、病原菌の生育速度を解析することにより、各種病原菌に対する香気成分の抗菌活性を調査した。

#### 4. 研究成果

ペチュニア花弁を用いて実験を実施した。ペチュニア花弁を6つの生育段階に分けて、それぞれの香気関連物質の定性・定量分析を行った。その結果、ペチュニア花弁が生育するにつれて香気関連物質の内生量が顕著に増加した。また、ペチュニア花弁において香気関連物質前駆体である揮発性化合物も検出された。この結果はバラなどの香気関連物質の代謝と非常に類似していることを明らかにした。

ペチュニア花弁から粗酵素抽出、硫酸アンモニウム沈殿、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラムを用いて、香気関連物質生成活性に基づいて、目的とする生合成酵素を精製した結果、45 - 55 kDa 付近のタンパク質を得て、精製タンパク質をペプチド解析するために、断片化した後、LC-MS/MS を用いてペプチド配列解析を行った結果、9つのペプチド配列を取得した。ペチュニア RNA-seq データを用いてペプチド配列に由来するタンパク質を探索した結果、PhM1 の cDNA 配列を得た。PhM1 を用いて大腸菌異種発現系により香気関連物質生合成酵素を調製し、酵素活性試験を行った結果、香気関連物質を得た。また開花段階別および日周期における PhM1 の発現量は、香気関連物質と相関を示した。以上より、PhM1 は香気関連物質生合成酵素であり、ペチュニア花弁における香気関連物質の生合成および貯蔵に寄与していることを明らかにした。今後、PhM1 のノックアウト株などを作出し、花弁の展開度や香気関連物質内生量の変化などを評価することで、PhM1 の生理学的機能、また花弁展開における香気関連物質の生化学的役割を明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koeduka Takao, Ueyama Yukiko, Kitajima Sakihito, Ohnishi Toshiyuki, Matsui Kenji	4. 巻 252
2. 論文標題 Molecular cloning and characterization of UDP-glucose: Volatile benzenoid/phenylpropanoid glucosyltransferase in petunia flowers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 153245 ~ 153245
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jplph.2020.153245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山 日向子, 中馬 かれん, 佐藤 浩平, 間瀬 暢之, 竹内 純, 轟 泰司, 笹浪 知宏, 三浦 謙治, 渡辺 修治, 大西 利幸
2. 発表標題 バラ花弁における香り成分の発散メカニズムに関わる糖加水分解酵素
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小木曾 こはる, 小掠 由樹, 佐藤 浩平, 間瀬 暢之, 竹内 純, 轟 泰司, 肥塚 崇男, 渡辺 修治, 大西 利幸
2. 発表標題 ペチュニアにおける香りアシル化配糖体の生合成解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝又 章椰, 加藤 美香, 大澤月穂, 藤川紘樹, 佐藤 浩平, 間瀬 暢之, 周藤 美希, 八幡 昌紀, 杉山 啓介, 奥田 徹, 竹内 純, 轟 泰司, 大西 利幸
2. 発表標題 ブドウにおける香り二糖配糖体の貯蔵メカニズムの解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 利幸, 塚原 壮彦, 竹本 裕之, 佐藤 浩平, 間瀬 暢之, 竹内 純, 轟 泰司
2. 発表標題 植物における揮発性有機化合物の配糖化酵素の機能解明
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚原壮彦・海山香菜子・肥塚崇男・竹本裕之・竹内純・轟 泰司 ・佐藤浩平 ・間瀬暢之 ・大西利幸
2. 発表標題 サツマイモ由来香気配糖化酵素の生化学的研究
3. 学会等名 第64回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2020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
研究分担者	竹内 純  (Takeuchi Jun)  (00776320)	静岡大学・農学部・准教授    (13801)	

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
---------	---------