

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05840

研究課題名(和文)ナス科植物における花香の生成放散機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of floral scent production and emission in Solanaceae plants

研究代表者

肥塚 崇男 (Koeduka, Takao)

山口大学・大学院創成科学研究科 准教授

研究者番号：30565106

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)：ナス科植物では夜間特異的に香気成分を生成し、夜行性の蛾を受粉媒介者として誘引するなど高度な共生機構を進化させてきた。しかし、植物細胞内で生成された香気成分がどのように大気中へ放散されるのか、特に配糖化や輸送担体の香気生成放散への影響は不明である。本研究ではペチュニアやタバコを用いて、異なる開花段階、昼夜の異なる時間帯で網羅的な代謝物分析並びにRNA-seq解析を行った。その結果、香気成分の生合成遺伝子に加えて、配糖化遺伝子や輸送体遺伝子が同調発現していることが判明した。さらに、得られた配糖体化酵素は揮発性ベンゼノイドや中間体である安息香酸に配糖化活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生成された香気成分は葉などの栄養器官では配糖体として蓄積され、植物自身の毒性回避や植食者への撃退に備え蓄積される。一方、花などの繁殖器官で香気成分がなぜ配糖体として蓄積されるのか、また、どのようにして細胞内から植物体外に運ばれるのか、その放散メカニズムは不明である。本研究は植物細胞内で生合成された香気成分が配糖体化酵素による貯蔵、輸送体や脂質輸送タンパク質を介して大気中へと放散される可能性を分子レベルで示唆したものであり、香気生成の人為的制御を考える上で重要である。花香を利用した天敵昆虫による生物の害虫防除や香料創作など新たな香りビジネスの技術開発にも貢献できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Solanaceae plants produce floral scent at night and attract nocturnal moths as pollinators. However, it is unclear how the floral scents produced in plant cells are emitted into the atmosphere, especially the effects of glycosylation and transport carriers on the production and emission of floral scents. In this study, we performed comprehensive metabolite and RNA-seq analyses at different flowering stages and at different times of the day and night in petunia and tobacco, which are model plants of the Solanaceae family. The results showed that the biosynthetic genes of the floral scents highly expressed at night, and glycosyltransferase and transporter genes also showed similar expression pattern. Furthermore, we found that the isolated glycosyltransferases exhibit glycosylation activity toward volatile benzenoids and the intermediate, benzoic acid.

研究分野：植物生化学

キーワード：香気成分 配糖体化 輸送担体 揮発性ベンゼノイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球上に生命が誕生して以来、様々な外的要因に適応し、約 40 億年の進化を遂げてきた結果が現存の生物種である。植物も巧妙な生存戦略システムを獲得しており、その一つが情報化学物質としての「香気成分」を作り出す能力である。南米原産のペチュニアでは揮発性ベンゼノイドを香気成分として生成放散し、夜行性の蛾を受粉媒介者として誘引するなど極めて高度な共生機構を進化させてきた。このように、植物香気成分は生態系の中で重要な機能を担っているものの、どのように生合成され大気中へ放散されるのか、特に配糖体化や輸送担体の香気成分生成放散への作用機作は未だに解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナス科植物ペチュニアやタバコを材料に、揮発性ベンゼノイドの配糖体化、輸送担体を介した動態制御を通じて香気成分の生成放散メカニズムを分子レベルで解明する。ペチュニアやタバコを実験材料として、香気成分およびその配糖体の組成および生成量について、異なる器官や開花段階、昼夜の日周性に関して詳細な代謝物分析を行う。さらに、香気成分配糖体化酵素の同定を行い、その基質特異性など酵素学的特性を解析するとともに、ノックアウト体を作成し放散される香気成分組成やその量的変化を精査する。また、花卉における網羅的遺伝子発現解析を通して、揮発性ベンゼノイドの輸送担体の探索を行う。得られる酵素、タンパク質の機能解析から、配糖体化や輸送担体を介した香気成分の生成放散制御機構に関する新たな基礎的知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- 1) 揮発性ベンゼノイドを主要香気とするペチュニア (*Petunia hybrida*) およびタバコ (*Nicotiana glauca*) において、香気成分およびその配糖体の詳細な代謝物変動を明らかにする。
- 2) 異なる器官や開花段階、昼夜の日周性に関して、トランスクリプトーム解析を行い、揮発性ベンゼノイドの蓄積や輸送に関わる酵素、タンパク質を単離し、その酵素学的性状を明らかにする。
- 3) 上述 2) で得られた遺伝子の発現抑制もしくはノックアウト形質転換体を作成し、生体内における香気成分の生成、放散への影響を明らかにする。

### 4. 研究成果

1) ナス科植物の主な花香成分である揮発性ベンゼノイドの蓄積や輸送に関わる酵素、タンパク質がいつ、どこで高く発現しているのかを調べるために、まず、香気成分およびその配糖体の生成量について詳細な代謝物分析を行った。その結果、17 時に採取したペチュニア (*Petunia hybrida*) では、ベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒド、ベンジルアルコール、安息香酸メチル、2-フェニルエタノール、安息香酸ベンジル、イソオイゲノールが開花に伴って生成し始め、開花 4 日後まで高い生成量を維持していた。さらに、昼夜の異なる時間帯では、昼間 (8:00-17:00) に生成量が低く、夜間 (20:00-5:00) に多く生成していることが判明した。一方、タバコ (*Nicotiana glauca*) の代謝物分析では、花卉の中でも花冠特異的にベンジルアルコール、サリチル酸ベンジル、5-メトキシオイゲノールが検出され、いずれの化合物も朝方 4:00 に生成量は最大値を示した。他方、それら配糖体については昼夜で生成量に大きな変化は見られなかった。これらの結果から、花香成分の蓄積に関わる配糖体化酵素遺伝子は開花段階の後期あるいは花冠で発現量が高い可能性が考えられた。

2) 開花段階および時間帯特異的に香気成分の生成量が変化していたことから、ペチュニアの開花段階別 (stage 2, stage 4, stage 5, 開花 0-1 日後、開花 3-4 日後、葉) ならびに昼夜 3 時間ごと (2:00, 5:00, 8:00, 11:00, 14:00, 17:00, 20:00, 23:00) のサンプリングを行い、RNA を抽出した。これら RNA サンプルをトランスクリプトーム解析に供し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、主要な揮発性ベンゼノイドの生合成遺伝子 (*PAL*, *C4H*, *CFAT*, *EGS*, *IGS*, *BSMT*, *PAAS*, *CNL*, *KAT*) ならびに、それらを制御している転写因子 (*ODO1*, *EOB1*, *EOB11*) において、揮発性ベンゼノイドの生成量と正の相関を示す発現パターンが見られた。さらに、これら揮発性ベンゼノイドの生合成遺伝子と同調する発現プロファイルを示す配糖体化酵素遺伝子 (*PhUGT*) や輸送体 (*PhABC*)、脂質輸送タンパク質 (*PhLTP*) を見出すことに成功した。これらの結果から、生合成された花香成分の放散には花香成分の生合成遺伝子に加えて配糖体化酵素や輸送体、脂質輸送タンパク質が関与し、放散量を調節していることが考えられた。一方、タバコでは葉、蕾、花冠においてトランスクリプトーム解析を行い、揮発性ベンゼノイドおよびその配糖体が多かった花冠に特異的に発現する配糖体化酵素遺伝子 (*NsUGT*) を単離した。

- 3) 得られた配糖体化酵素の配糖化活性および基質特異性を明らかにするために、大腸菌発現

系を用いた異種発現により組換え酵素を調製し、揮発性ベンゼノイドおよび類縁化合物計 16 種の化合物に対する相対活性試験を行った。その結果、PhUGT および NsUGT 共に、揮発性ベンゼノイドの中間体である安息香酸に高い酵素活性を示すことを明らかにした。また、PhUGT においては、花香成分であるイソオイゲノール、オイゲノール、バニリンに対しても配糖体化活性を示すことが判明した。このことからペチュニアおよびタバコ花卉では、揮発性ベンゼノイドだけでなく生合成中間体を配糖体としてトラップすることで放散量を調製していることが考えられた。現在、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により形質転換ペチュニアおよびタバコの作出を行っており、今後、UGT や輸送体、脂質輸送タンパク質の花香生成への影響を明らかにする。

#### Elucidation of the mechanism of floral scent production and emission in Solanaceae plants

ナス科植物では夜間特異的に香気成分を生成し、夜行性の蛾を受粉媒介者として誘引するなど極めて高度な共生機構を進化させてきた。しかし、植物細胞内で生成された花香成分がどのように大気中へ放散されるのか、特に配糖化や輸送担体の花香生成放散への影響は不明である。本研究ではナス科のモデル植物であるペチュニアやタバコを用いて、異なる開花段階、昼夜の異なる時間帯で網羅的な代謝物分析並びに RNA-seq 解析を行った。その結果、花香成分の生合成遺伝子に加えて、配糖化遺伝子や輸送体遺伝子が同調発現していることが判明した。さらに、得られた配糖体化酵素は揮発性ベンゼノイドや中間体である安息香酸に配糖化活性を示すことを明らかにした。

Solanaceae plants produce floral scent at night and attract nocturnal moths as pollinators. However, it is unclear how the floral scents produced in plant cells are emitted into the atmosphere, especially the effects of glycosylation and transport carriers on the production and emission of floral scents. In this study, we performed comprehensive metabolite and RNA-seq analyses at different flowering stages and at different times of the day and night in Petunia and Tobacco, which are model plants of the Solanaceae family. The results showed that the biosynthetic genes of the floral scents highly expressed at night, and glycosyltransferase and transporter genes also showed similar expression pattern. Furthermore, we found that the isolated glycosyltransferases exhibit glycosylation activity toward volatile benzenoids and the intermediate, benzoic acid.

生成された香気成分は葉などの栄養器官では配糖体として蓄積され、植物自身の毒性回避や植食者への撃退に備え蓄積される。一方、花などの繁殖器官で香気成分がなぜ配糖体として蓄積されるのか、また、どのようにして細胞内から植物体外に運ばれるのか、その放散メカニズムは不明である。本研究は植物細胞内で生合成された花香成分が配糖体化酵素による貯蔵や輸送体や脂質輸送タンパク質を介して大気中へと放散される可能性を分子レベルで示唆したものであり、花香生成の人為的制御を考える上で重要である。花香を利用した天敵昆虫による生物的害虫防除や香料創作など新たな香りビジネスの技術開発にも貢献できることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe B, Nishitani S, Koeduka T.	4. 巻 64
2. 論文標題 Synthesis of deuterium-labeled cinnamic acids: Understanding the volatile benzenoid pathway in the flowers of the Japanese loquat <i>Eriobotrya japonica</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Labelled Comp Radiopharm.	6. 最初と最後の頁 403-416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jlcr.3933.	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 -
1. 著者名 Koeduka T, Takarada S, Fujii K, Sugiyama A, Yazaki K, Nishihara M, Matsui K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Production of raspberry ketone by redirecting the metabolic flux to the phenylpropanoid pathway in tobacco plants.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metab Eng Commun.	6. 最初と最後の頁 e00180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mec.2021.e00180.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takao Koeduka, Yukiko Ueyamaa, Sakihito Kitajimab, Toshiyuki Ohnishic, Kenji Matsui	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
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 -
1. 著者名 Nobukazu Shitan, Shiori Nishitani, Akiko Inagaki, Yoko Nakahara, Yasuyuki Yamada, Takao Koeduka	4. 巻 33
2. 論文標題 Gene expression analysis of the ATP-binding cassette transporter ABCD1 in petunia ( <i>Petunia hybrida</i> ) and tobacco ( <i>Nicotiana</i> spp.)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Gene	6. 最初と最後の頁 100391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plgene.2022.100391	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 肥塚崇男
2. 発表標題 進化の過程で最適化された植物揮発性化合物の生成制御機構：代謝工学による人為的改変は可能か？
3. 学会等名 日本農芸化学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 肥塚崇男、上山由記子、北島佐紀人、大西利幸、松井健二
2. 発表標題 ペチュニア花香配糖体の生合成に関わる糖転移酵素の機能解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 肥塚崇男
2. 発表標題 植物香気成分の生合成分子機構の解明と代謝改変に関する研究
3. 学会等名 日本植物バイオテクノロジー学会（招待講演）
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
研究分担者	真野 純一  (Mano Jun'ichi)  (50243100)	山口大学・大学研究推進機構・教授    (15501)	

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