

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06019

研究課題名(和文) 配糖化プロセスの特性に着目したマンゴー果実の香り貯蔵機構の把握

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of the biosynthesis of glycosidically-bound aroma precursors in *Mangifera indica* L. cv. Irwin

研究代表者

岡田 貴裕 (Okada, Takahiro)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30584809

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)：アーウィン種マンゴーは食味・生産性に優れる一方で、登熟が進むにつれ炭疽病に罹りやすく、品質管理が難しいことで知られる。本課題では、化学防御機能に優れたモノテルペンアルコール類の配糖化プロセス(貯蔵経路)に着目し、果実の脆弱性に関わる生理的要因を探ることとした。研究計画を遂行することにより、ゲノム情報および関連遺伝子情報を網羅するとともに、モノテルペンアルコール類の配糖化に特化したUDP-糖転移酵素群の同定を達成した。また、果実におけるモノテルペンアルコール配糖体の合成効率が登熟に連動することを明示し、本現象が配糖化経路よりむしろ、二次代謝系の特性に起因する可能性を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究開始当初、マンゴーのゲノム情報は未解読であり、生体防御機構やその分子基盤に関する情報は非常に限られていた。本研究において化学防御機能に特化した香り成分の貯蔵プロセスとその特性、二次代謝関連遺伝子群の情報を網羅したことで、アーウィン種マンゴーの耐病性についてより具体的な検討・考察が可能となる。これを達成することにより、将来的に優良品種の育種や品質管理・高付加価値化の方針が得られると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mangifera indica L. cv. Irwin is known for its excellent taste and productivity, but it is also susceptible to anthracnose as it matures, making quality control difficult. This project focused on the storage pathway of monoterpene alcohols, which have excellent chemical defense functions, and explored the physiological factors involved in fruit vulnerability. As a result, comprehensive genomic information was obtained for this cultivar, and a group of UDP-glycosyltransferases specific to the storage of monoterpene alcohols was identified. Furthermore, the results revealed that the biosynthetic efficiency of glycosidically bound monoterpene alcohols in fruit is linked to maturation and that this phenomenon may be due to the characteristics of the secondary metabolic system rather than the glycosylation pathway.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：配糖体 香り成分 糖転移酵素 マンゴー 果実

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物はさまざまな香気成分を合成する。その多くは揮発性アルコール類に分類され、情報伝達や生体防御に重要な役割を果たすことで知られるが、合成後すぐに細胞外へ昇華し、膜損傷を引き起こしやすいというデメリットを持つ。このような不都合を回避するため、植物は UDP-糖転移酵素 (UGT) を用いて香気成分に糖を付加し、配糖体として安定的に液胞に貯蔵する仕組みを発達させてきた。近年では、香気配糖体の糖部分が生物的ストレス応答時に切り離され、遊離したアグリコンが迅速に化学防御反応を惹起することが明らかにされつつあり、耐病性との関連に注目が集まっている。

マンゴーは代表的な熱帯果樹であり、南九州地域を中心にアーウィン種のブランド化が推進されている。本品種は食味・生産性に優れる一方で、登熟が進むにつれ炭疽病に罹りやすく、品質管理が難しいことで知られる。この特性は、湿度や剪定残渣などの環境要因に起因するものと考えられてきたが、現在もお不明な点が多く残されたままである。その理由として、本品種のゲノムが未解読であり、生体防御機構に関する知見が十分に得られていないことが挙げられる。そこで、研究代表者は香気成分、特に、化学防御機能に優れたモノテルペンアルコール類の配糖化プロセスに着目し、アーウィン種の脆弱性に関わる生理的要因を探ることとした。

2. 研究の目的

本研究では、アーウィン種マンゴーのゲノム情報を網羅的に取得し、生化学的検討を通じてモノテルペンアルコール類の配糖化に特化した UGT ファミリーを同定することを目的とする。さらに、登熟下の果実における香気配糖体の組成変化と種々の遺伝子発現との相関を検討し、アーウィン種の耐病性に関わる生理的要因について洞察を得ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ドラフトゲノムデータの作成

アーウィン種マンゴーの葉組織より抽出した全ゲノム DNA を用いて解析用ライブラリを調製し、Illumina NovaSeq 6000 および Oxford Nanopore Technologies MinION シークエンサーでリードデータを取得した。これらを用いて MaSuRCA プログラムによるハイブリッド・デノボアセンブリを実施し、コンティグを作成した。さらに、研磨処理を施したのち、冗長な配列を除くことでドラフトゲノムデータを精密化した。

(2) 組換え体を用いた UGT ファミリーの機能解析

ドラフトゲノムデータから UGT ファミリーの遺伝子配列情報を網羅的に取得し、20 種類の候補遺伝子を対象に pET システムを利用した一次スクリーニングを行った。本検討では、対象遺伝子を導入した大腸菌をガラニオール含有 M9 培地中で培養し、0.2 mM IPTG 添加より 16 時間後における本基質の配糖化反応の成否を基準とし、目的 UGT ファミリーの絞り込みを行った。さらに、同手法で種々の基質を用いた二次スクリーニングを実施し、モノテルペンアルコール類の配糖化に特化した UGT ファミリーを決定した。

(3) 香気配糖体の抽出・アグリコンの組成分析

登熟初期、中期、後期の果実をサンプリングし、果皮および果肉の凍結破砕物から水抽出物を調製した。複合ポリマー樹脂を用いて本試料より配糖体成分を回収し、蒸発乾固後の粗抽出物を 5 g/L クエン酸溶液中で加熱処理することで糖部分を加水分解した。さらに、本処理で生成した揮発性アグリコンをヘッドスペース法で回収し、それらの組成をガスクロマトグラフ質量分析法で検討した。

(4) RNA-seq を利用した関連遺伝子群の比較発現解析

登熟初期、中期、後期の果実より、果皮および果肉の全 RNA を抽出した。本試料を用いて解析用ライブラリを調製し、Illumina NovaSeq 6000 でリードデータを取得した。さらに、HISAT2 プログラムを用い

でリファレンスゲノムデータに対するマッピングを行い、得られたカウントデータをもとに香気配糖体の合成に関わる遺伝子群の転写レベルの変動を比較解析した。

4. 研究成果

(1)アーウィン種マンゴードラフトゲノムデータの構築

次世代および第3世代シーケンサーで取得したリードデータをもとに、合計 742 個のコンティグデータを構築した(合計長:385.5 Mb, N50:1,588,799)。本データは合計 35,957 個のタンパク質コード遺伝子を含み、BUSCO スコアは Complete:84.18%、Duplicated:15.18%、Fragmented:0.34%、Missing:0.3%と、約 99.4%の遺伝子情報を網羅していることが示唆された。また、染色体レベルのアセンブリが達成されているアルフォンソ種との比較結果からも、良質なドラフトゲノムデータを構築できたものと判断した(表1)。

表1. アーウィン種およびアルフォンソ種のゲノムデータに含まれる遺伝子数の比較

	Irwin (draft assembly)	Alphonso (GCF_011075055.1)
mevalonate pathway-related enzymes	7	7
methylerythritol phosphate pathway-related enzymes	8	8
geranyl diphosphate synthase (GPPS)	1	1
monoterpene synthase (MTS)	31	24
UDP-glycosyltransferase (UGT)	248	250

(2)モノテルペンアルコール類の配糖化に特化した UGT ファミリーの同定

植物型 UGT との比較に基づく相同性解析の結果から、今回作成したドラフトゲノムデータに 248 種の UGT 遺伝子が含まれることが明らかとなった(図1A)。さらに、二次スクリーニングを通じて、11 種の UGT がモノテルペンアルコール類の配糖化を触媒することを明らかにした。興味深いことに、これらはいずれも環状式モノテルペンアルコール類に対して糖転移活性を発揮せず、ゲラニオール、リナロール、ネロールといった非環式モノテルペンアルコール類の配糖化に特化した基質特異性を持つことが判明した(図2)。

以上の UGT には、二次代謝物の配糖体化を担う植物型 UGT に特徴的な PSPG-Box が保存されていたほか、近縁の UGT に見られないユニークなモチーフが共有されていることが明らかとなった。また、アミノ末端領域に葉緑体局在化シグナルの存在が推定されたものは8種に限られ、これらがモノテルペンアルコール類の配糖化プロセスにおいて中心的な役割を担うことが推定された(図1B)。

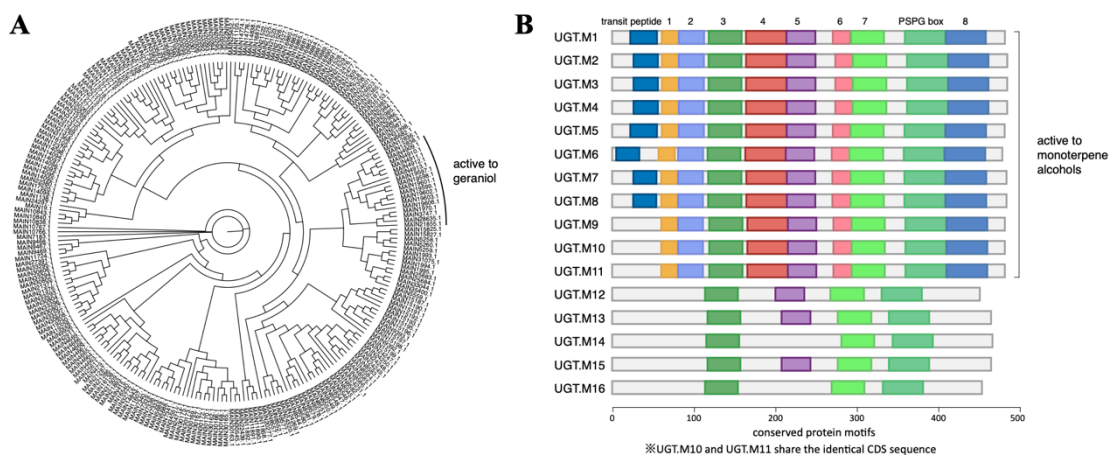


図1. UGT候補遺伝子群にコードされるタンパク質の系統樹およびモチーフ解析結果

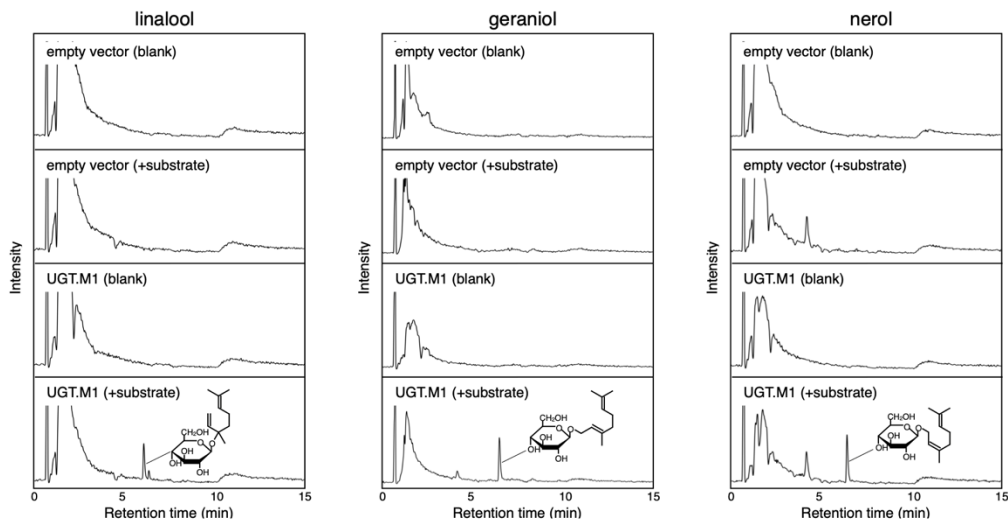


図2. 非環式モノテルペンアルコール類に対する糖転移活性 (UGT.M1のみを示す)

(3) 登熟下の果実における香気配糖体の貯蔵状態の検討

固相マイクロ抽出/GC-MS 法により、登熟初期、中期、後期の果皮および果肉に貯蔵される香気配糖体アグリコンの質的・量的変化を検討した。詳細は控えるが、図3に香気配糖体アグリコンの相対変化率を示す。

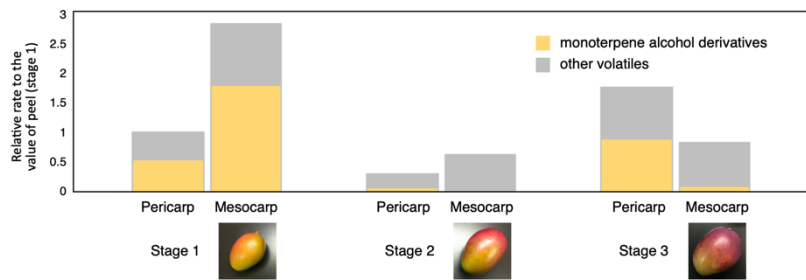


図3. 登熟下の果実に貯蔵される香気配糖体アグリコンの組成変化

登熟初期の果実は香気配糖体を豊富に含み、その大部分をモノテルペンアルコール類が占めていた(図3)。また、香気配糖体の貯蔵効率は登熟が進むにつれて顕著に変動し、果皮、果肉のいずれにおいても、モノテルペンアルコール類の貯蔵量は登熟中期に著しく減少していた。この停滞は、後期になると果皮のみで回復しており、果実における香気配糖体の合成効率が成長段階・部位特異的に変動することが明示された(図3)。

(4) 登熟下の果実における香気配糖体関連遺伝子群の発現変化

果実における香気配糖体の貯蔵変動の分子基盤を把握することを目的とし、モノテルペノイド生合成関連遺伝子群、および UGT 遺伝子群の発現プロファイルを取得した。まず、8 種の目的 UGT 遺伝子の場合では、香気配糖体の貯蔵効率との間に明確な相関は見られなかった(図4A)。特に、果皮ではこれらが協調的に発現していたことから、登熟全期間を通じ、モノテルペンアルコール類の配糖化プロセスが一定以上のレベルで維持されているものと示唆された(図4A)。

一方で、果皮、果肉ともに、モノテルペンアルコール類の前駆物質、すなわちゲラニル二リン酸の合成に至るまでの上流経路に変化は見られず(データは省略する)、モノテルペノイド合成酵素遺伝子群の発現状態が登熟に応じて顕著に変動することが明らかとなった(図 4B, 4C)。これらの酵素は、いずれもゲラニル二リン酸を利用して特定のモノテルペノイドを生成する。したがって、登熟に連動した香気配糖体の貯蔵変化は、主に前駆物質に対するモノテルペノイド合成酵素群の競合に起因するものと推察された。

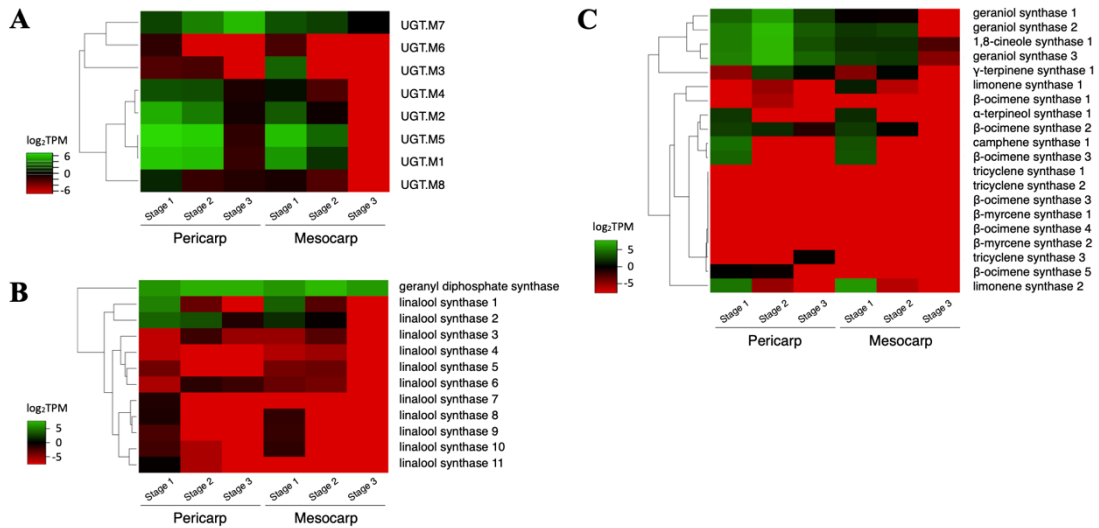


図4. 登熟下の果実における UGT 遺伝子群およびモノテルペン合成酵素遺伝子群の発現変動

(5)総括

本研究では、アーウィン種マンゴーの遺伝情報を網羅するとともに、モノテルペンアルコール類の配糖化に特化した UGT の同定を達成した。また、果実における香気配糖体の合成効率が登熟に連動することを明示し、本事象が配糖化経路よりむしろ、二次代謝系の特性に起因する可能性を示した。以上の成果に加え、アーウィン種より見いだした類縁の糖転移酵素の X 線結晶構造解析を達成し、そのユニークな基質認識機構を報告した。

以上を総合すると、果実の化学防御機構は登熟中期に脆弱化し、果皮において炭疽病菌の潜在的感染が生じやすい状況が作り出される可能性が考えられる。今後は、香気配糖体の化学組成を精査するとともに、モノテルペン合成酵素群の特性を詳細に検討することが重要な課題となる。これらを実現できれば、アーウィン種の耐病性に寄与する分子基盤の一端を明らかにでき、品質管理や育種に役立つ知見が得られるものと期待できる。

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 Okada Takahiro, Teramoto Takamasa, Ihara Hideyuki, Ikeda Yoshitaka, Kakuta Yoshimitsu	4. 巻 34
2. 論文標題 Crystal structure of mango 1,3/ 1,4-fucosyltransferase elucidates unique elements that regulate Lewis A-dominant oligosaccharide assembly	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/glycob/cwae015	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田貴裕
2. 発表標題 登熟下のマンゴー果実における香気配糖体の貯蔵制御機構の解明
3. 学会等名 第45回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田貴裕
2. 発表標題 香気成分の貯蔵に関わるマンゴーUDP-糖転移酵素の探索
3. 学会等名 第44回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田貴裕, 井原秀之, 池田義孝
2. 発表標題 マンゴー果実におけるUGT遺伝子発現と香気配糖体の生合成との相関
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田貴裕, 井原秀之, 池田義孝
2. 発表標題 マンゴー果実における交差反応性糖鎖抗原の発現特性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------