

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06166

研究課題名(和文) マツタケ生活環におけるフェニルプロパノイド代謝の役割解明

研究課題名(英文) A possible role of phenylpropanoid metabolism in life cycle of *Tricholoma matsutake*

研究代表者

服部 武文 (HATTORI, Takefumi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：60212148

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)：本研究の最終目的は、マツタケの主要な香り成分の一つである、ケイ皮酸メチル生合成機構の解明である。ケイ皮酸のメチル基転移酵素活性を、ケイ皮酸メチル生合成が誘導されたマツタケ培養菌系から、酵素反応生成物をTLCによる精製・濃縮により検出した。本培養菌系より得たmRNAに由来する候補cDNAで大腸菌を形質転換し、菌の超音波破碎後の可溶性画分及び不溶性画分から、当該活性を示す精製組換え酵素を得た。加熱失活酵素は活性を示さなかった。こうして、S-adenosyl-L-methionine依存ケイ皮酸carboxyl methyltransferaseをコードするcDNAがマツタケよりクローニングされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケイ皮酸carboxyl methyltransferaseが、植物以外で初めて見出されたことが学術的意義である。今後本酵素と植物の同酵素との類似点相違点を解明し、これまで未解明であった植物以外の本酵素の特性、進化の特徴を解明できる。一方、このケイ皮酸メチルは子実体形成に伴う含有量の増加、菌食性動物ヒメツチトビムシの忌避作用から、自然界のマツタケシロを保護し、本菌の生活環で重要な働きをしている。本研究でマツタケにおけるケイ皮酸メチル生合成を遺伝子レベルで研究できる結果を示したので、絶滅危惧種「危急」であるマツタケの生活環を、ケイ皮酸メチルを軸に研究できるようになったことが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Methyl cinnamate is one of the major odor components in *Tricholoma matsutake*. The goal of this study is to elucidate molecular mechanisms for methyl cinnamate biosynthesis in *T. matsutake*. The cinnamate carboxyl methyltransferase activity was detected from cell-free extracts prepared from mycelia of *T. matsutake* induced the methyl cinnamate biosynthesis. Then, we transformed *Escherichia coli* BL21(DE3) with candidate cDNAs generated from mRNAs from *T. matsutake*. We purified the recombinant protein from a soluble fraction and a cell debris obtained by sonication of the *E. coli* cells with the activity. No activity was detected from negative control. The results clearly show that we have cloned cDNA encoding carboxyl methyltransferase activity for cinnamate in the presence of S-adenosyl-L-methionine. The results will contribute to elucidate mechanisms for methyl cinnamate formation in the fruit body of *T. matsutake* in nature.

研究分野：森林微生物代謝科学

キーワード：マツタケ メチル基転移酵素 ケイ皮酸メチル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ケイ皮酸メチルはマツタケ(*Tricholoma matsutake*)の主要な香り成分の一つである。主に子実体のヒダ、胞子に含有されていて、子実体形成に伴い、含有量が増加する(Ohta 1983)。さらに、ケイ皮酸メチルは菌食性動物ヒメツチトビムシを忌避するため(Sawahata *et al.*, 2008)、シロ菌系を保護し、マツタケ生活環において重要な働きをしていると示唆される。

ケイ皮酸メチルは、L-フェニルアラニンからケイ皮酸を経て生合成される (Hattori *et al.*, 2016)。ケイ皮酸 ケイ皮酸メチル過程は、ケイ皮酸を基質とするメチル基転移酵素、あるいは、シンナモイル CoA を基質とするアシル基転移酵素により、進行すると考えられる。植物のバジル (*Ocimum basilicum*) (Kapteyn *et al.*, 2007)、コケ類 (*Conocephalum salebrosum*) (Zhang *et al.*, 2019)では、ケイ皮酸 ケイ皮酸メチルを触媒する cinnamate carboxyl methyltransferase の cDNA が報告されている。担子菌類では褐色腐朽菌マツオオジ(Ohta *et al.*, 1991)では、メチル基転移酵素が司る。

申請者が本助成を受けて研究を始めた当初、マツタケにおいてケイ皮酸 ケイ皮酸メチル過程を司る、酵素活性の検出は未報告であった。しかし、田崎らによる先行研究において、メチル基転移酵素候補遺伝子に関し、解析が進められていた。即ち、田崎らはマツタケよりケイ皮酸

ケイ皮酸メチルを触媒する候補遺伝子をクローニングし、組換え酵素を用いて当該活性の検出を試みた。しかしながら、明確な活性を得る事が出来なかったと報告した。(田崎裕二 2016-2018 基盤(C)報告書)

このように、マツタケにおいてケイ皮酸 ケイ皮酸メチルの生合成機構に関しては、未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マツタケ培養菌系よりケイ皮酸 ケイ皮酸メチルを触媒する酵素活性を検出し、同活性を有する酵素をコードする cDNA をクローニングすることである。本目的は、以下の研究内容を遂行することにより達成した。

- (1) マツタケ培養菌系よりケイ皮酸メチル生合成酵素活性の検出
- (2) ケイ皮酸 ケイ皮酸メチルを触媒するメチル基転移酵素をコードする cDNA クローニング

3. 研究の方法

- (1) マツタケ培養菌系よりケイ皮酸メチル生合成酵素活性の検出

(1)- 酵素活性誘導

マツタケ Tm08-09 株を Ohta 1990 の液体培地で 21 °C で静置培養した(Hattori *et al.*, 2016, 2019)。培養 20 日後 L-フェニルアラニンを 2.5 mM 添加し、さらに 14 日間同様に培養した。

(1)- ケイ皮酸メチル化酵素のアッセイ

培養過程に生合成されたケイ皮酸メチルと、酵素反応生成物を区別するため、酵素反応基質として重水素標識ケイ皮酸を用いた。Complete 系では無細胞抽出液を粗酵素とし、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mM S-adenosyl-L-methionine, 2 mM [2, 3, 4, 5, 6-²H₅]ケイ皮酸存在下、21 °C で overnight 反応させた。Negative control 系では、無細胞抽出液を 100 °C、30 min 加熱処理にて失活させ、同様に反応させた。反応後両系に内部標準として[2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-²H₇]ケイ皮酸メチルを添加し、酢酸エチル抽出した。抽出物を TLC 分離し、ケイ皮酸メチルと同じ Rf 値箇所から生成物、内部標準を精製した。

(1)- LC-MS/MS 分析による活性検出

0.1% 酢酸を含む 50% メタノール水溶液を移動相に用い、酵素反応生成物である重水素標識ケイ皮酸メチルを APCI にて [M+H]⁺ をプリカーサーイオンとして検出した。活性は以下の MRM 測定で観測された各生成物のイオン量を比較し、評価した。

酵素反応生成物 [2, 3, 4, 5, 6-²H₅]ケイ皮酸メチル: MRM transition m/z 168.10 135.10

内部標準物質 [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8-²H₇]ケイ皮酸メチル: MRM transition m/z 170.00 109.15

- (2) ケイ皮酸 ケイ皮酸メチルを触媒するメチル基転移酵素をコードする cDNA クローニング

(2)- 大腸菌を宿主とする組換えタンパク質の調製

当該 cDNA が挿入された pET-23a(+) により、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した。isopropyl β-D-thiogalactopyranoside にて発現を誘導し、細胞破碎後組換え粗酵素を含む可溶性画分を得た。

一方、細胞破砕物を、1%(v/v) Triton X-100 を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで破砕し、スラリーを氷中で 1 時間攪拌した。遠沈後 Triton X-100 を含まない同緩衝液で洗浄した。遠沈後ペレットを同緩衝液に懸濁し overnight 攪拌しながら組換え粗酵素を抽出した。これを可溶性画分と合し His-Bind resin にて精製した。

(2)- ケイ皮酸メチル化酵素のアッセイ

Complete 系では 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 mM S-adenosyl-L-methionine, 2 mM ケイ皮酸、精製酵素を含む反応溶液 400 μ l を、37 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。加 Negative control 系では、無細胞抽出液を 100 μ l、30 min 加熱処理にて失活させ、同様に反応させた。内部標準として、[2, 3, 4, 5, 6- 2 H₅] -ケイ皮酸メチルを用い、LC-MS/MS にて定量した。

(2)- LC-MS/MS 分析による活性検出

(1)- に記載の方法で、酵素活性を評価した。尚、移動相の条件は(1)- の方法とは異なっている。

4. 研究成果

(1) マツタケ培養菌系よりケイ皮酸メチル生合成酵素活性の検出の成果

酵素反応溶液を直接 LC-MS/MS 機器に注入した場合は、生成物が検出できず、TLC による精製・濃縮により検出された。加熱失活された粗酵素の 48 倍のメチル基転移酵素活性が、検出された。この結果により、マツタケ培養菌系はケイ皮酸のメチル化活性を持つことが示された。さらに、マツタケ培養菌系からケイ皮酸のメチル化活性を検出する方法を確立したことが成果である。

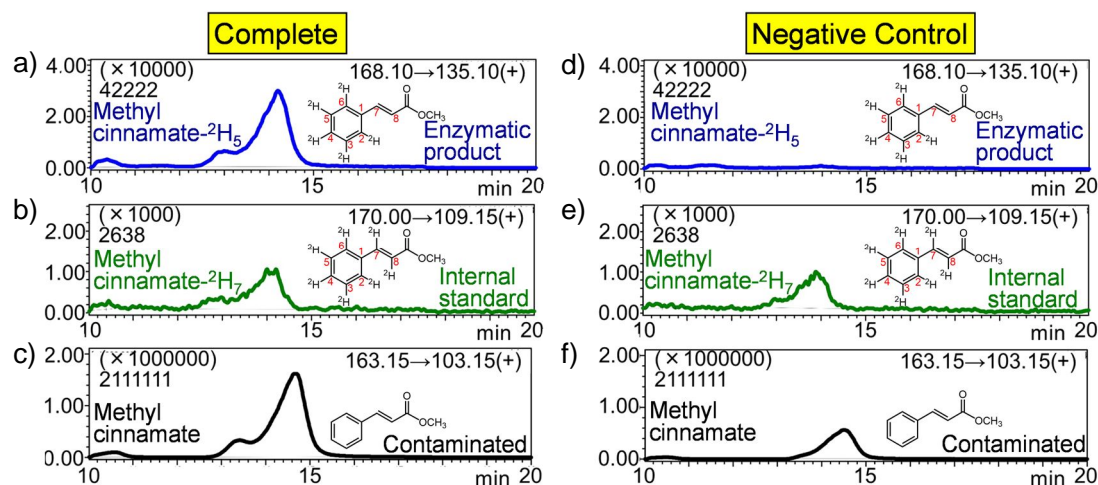


図 1. マツタケ菌系無細胞抽出物によるケイ皮酸メチル化酵素活性

Complete 系 a) 酵素反応生成物、b) 生成物定量の為に内部標準、c) 無細胞抽出物に含有されていたマツタケ菌系培養中における菌系内生合成ケイ皮酸

Negative control 系 d) 失活酵素反応生成物、e) 生成物定量の為に内部標準、f) 無細胞抽出物に含有されていたマツタケ菌系培養中における菌系内生合成ケイ皮酸

(第 71 回日本木材学会大会、服部ら発表)

(2) ケイ皮酸 ケイ皮酸メチルを触媒するメチル基転移酵素をコードする cDNA クローニングの成果

既往の cinnamate carboxyl methyltransferase をクエリーとし、マツタケ培養菌系の RNA-seq データベースに対し tblastn 検索したが、信頼性の高いホモログは見出せなかった。そこで、S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase をコードするとアノテーションされた配列の中から、選抜されたある遺伝子の cDNA を発現させた大腸菌が、ケイ皮酸のメチル化活性を示したことを、日本木材学会中国・四国支部大会第 32 回研究発表会で予報として報告した。さらに、当該大腸菌から部分精製した組換え酵素も、同活性を示したことを報告した(第 72 回日本木材学会大会)。さらに純度高く精製した、組換え酵素を用いた酵素反応により標品と同じリテンションタイムを示すケイ皮酸メチルが生成された(図 2)。尚失活酵素を用いた negative control ではケイ皮酸メチルは全く検出されなかった。このように、より純度高く精製した酵素が活性を示す事を示したので、ケイ皮酸メチル化酵素をコードする遺伝子のクローニングが完遂した事が成果として示された。

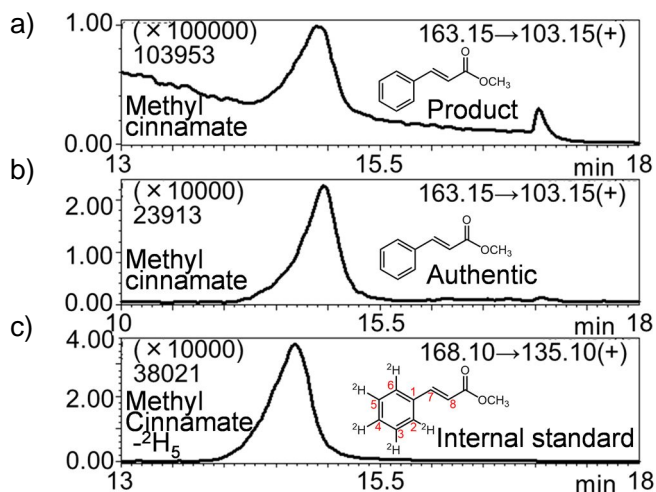


図 2. マツタケよりクローニングされた cDNA がコードする組換え酵素によるケイ皮酸メチル化酵素活性

a) 酵素反応生成物、b) 生成物標品、c) 生成物定量のための内部標準
(第 73 回日本木材学会大会、服部ら発表)

(1), (2)の成果をごく簡単にまとめると以下に集約される。この度助成をいただいた期間で、まず、マツタケ培養菌系由来無細胞抽出液より、S-adenosyl-L-methionine 存在下、ケイ皮酸 ケイ皮酸メチルのメチル基転移酵素活性を検出し、検出方法を確立した。次に、マツタケ培養菌系より当該活性を持つタンパク質をコードする cDNA をクローニングした。本 cDNA から調製した組換え酵素の特性解明を進め一部第 73 回日本木材学会大会にて報告した。さらに、自然界でのマツタケ子実体発生地を確認し、今後自然界での上記活性を示すタンパク質をコードする遺伝子発現を検討するフィールドを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 服部武文、片山恵、都築弘充、中井穂乃花、吉住真理子、阿部正範
2. 発表標題 マツタケのケイ皮酸メチル生合成酵素をコードするcDNAクローニングの試み（予報）
3. 学会等名 日本木材学会中国・四国支部第32回研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部武文、片山恵、岡本有未、山村正臣、都築弘充、中井穂乃花、吉住真理子、阿部正範
2. 発表標題 ケイ皮酸のメチル化酵素をコードするcDNAをマツタケからクローニングした
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部武文、片山恵、都築弘充、中井穂乃花、吉住真理子、阿部正範
2. 発表標題 マツタケ香り主成分ケイヒ酸メチル生合成酵素活性の検出
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部武文、片山恵、井田京介、岡本有未、山村正臣、吉住真理子、阿部正範
2. 発表標題 マツタケ由来ケイ皮酸メチル化酵素の組換え酵素調製方法の改良ー超音波破碎で得た不溶性画分からの酵素抽出ー
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023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	吉住 真理子 (YOSHIZUMI Mariko) (40822846)	徳島県立農林水産総合技術支援センター(試験研究部)・徳島県立農林水産総合技術支援センター(資源環境研究課)・ 専門研究員 (86103)	

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