

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580008

研究課題名(和文)ローズゼラニウムの香気成分生合成酵素遺伝子のクローニングと香りの分子育種への応用

研究課題名(英文)cDNA cloning of enzymes responsible for scent compound biosynthesis from rose geranium and their application for molecular breeding

研究代表者

田浦 太志 (Taura, Futoshi)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・准教授

研究者番号：00301341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではローズゼラニウムのモノテルペン系芳香成分であるシトロネロールの生合成遺伝子を単離するため若葉のトランスクリプトーム解析を行い、発現遺伝子データベースを構築した。次いで本データベースよりモノテルペン代謝酵素の候補遺伝子を得て組み換え酵素の活性を検討した。この結果、old yellow enzymeのホモログについてシトラールからシトロネロールへの二重結合還元反応を触媒することを確認した。ローズゼラニウムよりcitral代謝活性を有する酵素が得られたことは本植物のモノテルペン代謝機構を考える上で興味深く、また本酵素遺伝子はモノテルペン代謝の遺伝子工学的な改変に応用可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rose geranium produces citronellol, a monoterpene rosy-scent compound. In this study, I sequenced transcriptome of young leaves of the plant to establish an expressed sequence database. I explored candidate genes for monoterpene metabolism, and consequently, cloned three cDNAs encoding old yellow enzyme homologues. The recombinant enzymes exhibited double bond reductase activity producing citronellal from citral. It is quite interesting that rose geranium contains citral reducing enzymes possibly involved in monoterpene metabolism. The obtained cDNAs may be applicable to metabolic engineering to create plants with modified fragrance.

研究分野：植物生化学

キーワード：生合成 植物 遺伝子 精油

### 1. 研究開始当初の背景

ローズゼラニウム (*Pelargonium graveolens*) はバラ様の芳香を持ち、また害虫に極めて強い特性から園芸植物として近年人気が高まっている。

本植物はモノテルペン系精油の citronellol を高生産することが知られており、本化合物が芳香と昆虫忌避作用を決定する成分と考えられている。Citronellol 生合成遺伝子を決定することができれば、これを用いた遺伝子工学的手法により植物に新たな香りを付与し、また害虫抵抗性を高める新たな代謝工学を開拓できると考えられる。

1980年代に行われたローズゼラニウムの粗酵素液を用いた実験より、citronellol は NADPH 依存型の還元酵素によって geraniol の二重結合が還元されて生じると考えられてきた。しかしながら本還元酵素の精製や遺伝子クローニングは報告されておらず、本研究の開始当初、citronellol 生合成経路の酵素遺伝子に関する研究例は皆無であった。



図1 開花期のローズゼラニウム

### 2. 研究の目的

研究開始当初の背景をふまえ、本研究はローズゼラニウムにおいて citronellol 生合成に関与する二重結合還元酵素の遺伝子を初めてクローニングすること、および、得られた遺伝子より組み換え酵素を発現してその酵素学的性質を解析することを目的として設定した。さらにこれらの基礎研究を達成した場合には、酵素遺伝子を西洋ハッカ等の異種植物に導入し、発現することで新たな香りと害虫抵抗性を付与する分子育種を検討する計画とした。

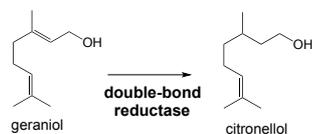


図2 Citronellol の推定生合成反応

### 3. 研究の方法

#### (1) ローズゼラニウム若葉のトランスクリプトーム解析

ローズゼラニウム若葉より mRNA を抽出、精製し、イルミナ社の truSeq RNA サンプル調製キットにより、断片化し末端にアダプター付加した形状の二本鎖 cDNA ライブラリーを調製した。次いでイルミナ社 Gemone Analyzer IIx を用いたショットガンシーケンスを行い、得られた短鎖配列についてソフトウェアとして Abyss および CLC genomic workbench を用いたアセンブルを行い、200bp 以上のコンティグを約 94 万種含むトランス

クリプトームデータを構築した。以下、標的遺伝子の探索に関しては本データベースの BLAST 解析により行った。

#### (2) 組み換え酵素の発現及び精製

上記データ解析により特定したモノテルペン代謝酵素の候補遺伝子に関しては、遺伝子特異的なプライマーを用いて cDNA 全長を増幅し、pQE80L ベクターに導入して、大腸菌 M15 株に形質転換した。得られた組み換え体を LB 培地で培養後、IPTG を添加して組み換え酵素の発現を誘導し、超音波処理にて細胞抽出液を調製して Ni Sepharose カラムにより SDS-PAGE 上単一の酵素を精製した。

#### (3) 組み換え酵素の活性測定

得られた組み換え酵素は pH7.0 のバッファー中、1mM NADPH を補酵素とし、1 mM geraniol あるいは citral を基質とする反応に供した。反応液についてヘキサンで抽出、濃縮後、GC-MS (Shimadzu, GCMS-QP5000) を用いた分析により生成物を確認した。

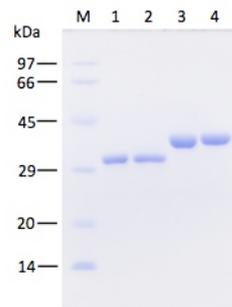
### 4. 研究成果

#### (1) モノテルペン還元酵素遺伝子の探索と機能解析

従来、citronellol は geraniol の二重結合が位置特異的に還元されることにより生成すると考えられてきた。モノテルペンの二重結合を還元する酵素としては、西洋ハッカの menthol 生合成に関与する menthone reductases など数種について遺伝子がクローニングされ、それらはいずれも酵素学的に short-chain あるいは medium-chain dehydrogenase/reductase ファミリーに分類されることが示されていた。

そこで citronellol 生合成経路の還元酵素についても これらと類似した配列を持つ可能性を考え、上記トランスクリプトームデータの BLAST 検索により、ローズゼラニウム若葉に short-chain 及び medium-chain それぞれ二種の還元酵素遺伝子が発現していることを確認した。

各遺伝子について RT-PCR により全長を増幅して発現ベクター pQE80L に組み込み、大腸菌を宿主として組み換え酵素を発現し SDS-PAGE 上単一にまで精製した。



SDS-PAGE of the recombinant enzyme.  
Lane 1 and 2: short-chain reductases.  
Lane 3 and 4: medium-chain reductases.

図3 モノテルペン還元酵素の SDS 電気泳動

精製した各組み換え酵素を用い、geraniolを基質とするアッセイを検討したが各酵素はいずれも geraniol から citronellol の還元反応を触媒しないことが確認された。

Geraniol を citronellol に還元する酵素活性はローズゼラニウム以外にバラ花卉でも報告され、citronellol は geraniol から生成すると信じられてきたが、citronellol がこれ以外の経路で生合成される可能性に関しても検討する必要があると考えられた。

## (2) Oxophytodienoic acid reductase (OPR) 関連酵素の cDNA クローニング

近年の研究から、ワイン醸造過程の酵母による geraniol から citronellol への生物変換の過程は、citral および citronellal を中間体として経路することが知られている。また酵母によるモノテルペン代謝には old yellow enzyme (OYE) が関与することが証明されており、OYE は citral から citronellal への二重結合の還元を触媒すると考えられている。OYE は FMN と結合した黄色酵素であり、NADPH の存在下、主に電子吸引性基に隣接する二重結合を還元する。本酵素は古くから研究されてきたものの生理的意義は不明であり、多様な基質と反応することが知られる。OYE のホモログは細菌、真菌、線虫及び植物など幅広い生物種に存在する。

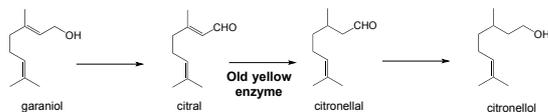


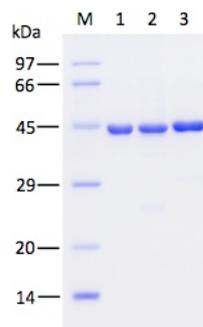
図4 酵母におけるモノテルペン代謝経路

植物における OYE のホモログとして peroxisome に局在しジャスモン酸生合成過程の二重結合還元反応を触媒する 12-oxophytodienoic acid reductase (OPR) が知られており、数種の植物で遺伝子レベルでの研究が進められている。また近年、極めて興味深いことに OPR に分類される酵素がテルペン代謝に関与する可能性を示唆する研究が複数報告されている。例えば、クソニンジン (*Artemisia annua*) において artemisinic aldehyde reductase は OPR のホモログである。さらに、生理的意義に関する議論こそなされていないものの、トマトの OPR-1 及び OPR-3 は citral と反応し、これを立体選択的に (S)-citronellal に還元する能力を有することが確認されている。

以上よりローズゼラニウムにおいて OPR 関連酵素がモノテルペン代謝に関与する可能性を考え配列相同性に基づく候補遺伝子の探索を行った。即ち、先に述べたと同様に発現遺伝子データベースの BLAST 検索を行い、ローズゼラニウム若葉に三種の OPR ホモログ (PgOPR-1~3) が発現していることを確認した。これらのうち、PgOPR-3 は C 末端に peroxisome への局在化シグナル (SKL motif)

を有し、また OPR と機能同定された酵素と高い相同性を示したことから、ローズゼラニウムにおいてジャスモン酸生合成経路の OPR として機能することが推察された。一方、PgOPR-1 及び 2 には SKL motif が観察されず、またホモロジー検索の結果、機能未知の OPR 関連配列とより高い相同性を示すことを確認した。

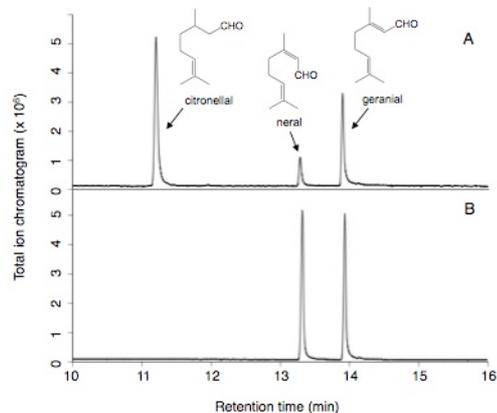
PgOPR-1~3 の酵素活性を確認するため、それぞれをコードする cDNA を RT-PCR で増幅して pQE80L に組み込み、大腸菌を宿主として酵素タンパクを発現、精製した。



SDS-PAGE of the recombinant enzymes. Lane 1, OPR-1; lane 2, OPR-2; lane 3, OPR-3

図5 OPR 関連酵素の SDS 電気泳動

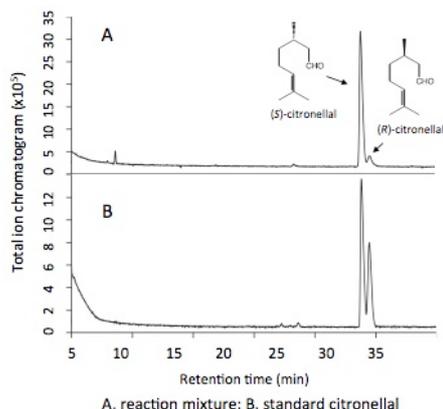
Citral を基質とするアッセイを行い、反応生成物を GC-MS で分析した結果、下図に示す通り PgOPR-1 は明確な citronellal 合成活性を示すことを確認した。本アッセイで基質として用いた citral は geraniol と neral という幾何異性体の混合物であるが、neral の減少が著しかったことから本酵素は neral と優先的に反応して citronellal を合成すると考えられた。また、PgOPR-2 及び 3 についても比較的弱いながら citral を還元し citronellal を合成する活性を有することを確認した。また、キラル GC の結果、これら酵素による還元反応はいずれも立体選択的に (S)-citronellal を与えることを確認した。



Total ion chromatogram of OPR-1 reaction product from citral. A, reaction mixture; B, reaction with heat denatured enzyme.

図6 OPR-1 による citral 還元反応の GC 分析  
A. 酵素反応液 B. コントロール

図7 OPR-1により合成した citronellal のキラルGC分析



A. 酵素反応生成物 B. (S)体及び(R)体の等量混合物

なお、最近ゴムの木 (*Hevea brasiliensis*) の OPR が geraniol を citronellol に還元すると報告されているが、PgOPR1~3 はいずれも geraniol とは反応しないことを確認した。

ローズゼラニウムは citral 及び citronellal を微量成分として含有することが報告されており、これらが citronellol 生合成経路の中間体として存在し、citral から citronellal の二重結合還元反応を PgOPR が触媒する可能性が考えられる。

以上のように本研究ではローズゼラニウムのモノテルペン代謝に関して検討を行った。当初想定した geraniol を citronellol に還元する酵素遺伝子は得られなかった一方、OPR 関連酵素が citral を citronellal に還元する活性を有することを確認した。Citronellal は citronellol と同様、昆虫忌避活性が強く、また柑橘系の独特な芳香を有する。このため本研究で得られた OPR 遺伝子を用いた代謝工学により、新たな特性を持つ植物の開発が可能と推察される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

飯島未宇、田浦太志、兼目裕充、高橋宏暢、豊田正夫、浅川義範、李貞範、黒崎文也、ローズゼラニウムのモノテルペン代謝に関する研究、第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、平成26年9月20日、和歌山市

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/shoyaku/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田浦 太志 (TAURA FUTOSHI)

富山大学大学院・医学薬学研究部 (薬学) 准教授

研究者番号：00301341

### (3) 連携研究者

浅川 義範 (ASAKAWA YOSHINORI)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：5033874

### (3) 連携研究者

兼目 裕充 (KENMOKU HIROMICHI)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10399438