

令和 2 年 8 月 24 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04871

研究課題名（和文）ナシ属果実成熟期に起こるデンプンの蓄積から代謝へのダイナミックな相転換の意義

研究課題名（英文）The significance of phase transition from synthesis to degradation of starch in *Pyrus* spp.

研究代表者

村山 秀樹（MURAYAMA, HIDEKI）

山形大学・農学部・教授

研究者番号：40230015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000 円

研究成果の概要（和文）：セイヨウナシ果実において、光合成速度は幼果期に高く、満開128日後にはほぼゼロになること、また、この時期に果肉のデンプンが蓄積から代謝への相転換を起こすことが判明した。糖についても、この時期を境にフルクトース、グルコース、ソルビトールは増加から減少に転じた。樹体においてもデンプンが蓄積したことから、同化産物の貯蔵期間として機能していることを確認した。一方、果梗はデンプンの貯蔵器官ではなく、樹体からの転流糖の輸送経路であることが示された。収穫によって果実の炭水化物の代謝が活性化された。収穫後のデンプンの分解については、追熟中と低温貯蔵中で、 β -アミラーゼ遺伝子の発現が異なることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セイヨウナシにおいて、果実が光合成を行っていることを確認し、光合成速度がゼロになる時期に、デンプンの蓄積から分解への相転換が起こっていることを明らかにした。また、セイヨウナシの分解過程に β -アミラーゼが重要であること、追熟中と低温貯蔵中で、 β -アミラーゼ遺伝子の発現が異なることが判明した。これらは、世界ではじめての報告であり、学術的に意義がある。セイヨウナシでは、成熟期のデンプン含量（ヨード反応）が収穫時期の判定指標の1つになっており、デンプンはセイヨウナシの栽培においても重要な因子である。そのため、本研究の成果は、今後収穫時期の判定にも利用される可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In pears, the rate of photosynthesis was higher in young fruit. Then it decreased and almost reached zero at 128 days after full bloom. At this time, the phase transition of starch occurred from accumulation to degradation. Fructose, glucose and sorbitol decreased at the same time. It was confirmed that starch accumulated even in the tree. On the other hand, starch was not observed in the peduncle. This shows that tree functions as storage organ of photosynthesis assimilates, and that peduncle is merely the pathway of assimilates. Harvest itself promoted carbohydrate metabolism in the fruit. The expression patterns of beta-amylase genes were different between fruit during ripening and storage at cold temperature.

研究分野：園芸利用学

キーワード：セイヨウナシ デンプン 糖代謝 成熟 収穫後生理 β -アミラーゼ

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バナナやキウイフルーツでは、果実の発育中にデンプンが蓄積する。その後、果実の成熟・追熟中に糖に変換し、果実が甘くなる。なかでも未熟なバナナでは、デンプン含量がきわめて高く、新鮮重量の約 20% を占める(野呂ら, 2011)。デンプンを最終産物として高濃度に蓄積するジャガイモやサツマイモと異なり、果実のデンプンの蓄積は一時的なものであり (transient accumulation), 収穫後その大半が糖に代謝される。また、カキ、モモ、ニホンナシ、トマト、メロンなど多くの果実において、収穫時にはデンプンがほとんど含まれていないが、発育中に一時的に蓄積する。果実において、なぜデンプンが一時的に蓄積するのか、また、なぜ果実はジャガイモやサツマイモのようなデンプンの貯蔵器官にならないのかなどの疑問が生じる。しかし、このような観点で研究された例はない。2013 年にトマトにおいて、解糖系にかかわる遺伝子をダウンレギュレートすると、デンプンの一時的な蓄積量が減少することが報告されたものの (Osorio et al., 2013), デンプンに関しては現象論に留まっている。さらに、多くの果実は果皮にクロロフィルを有し、光合成産物のシンク器官であるとともに、ソース器官でもある。しかしながら、果皮の光合成能力の生理学的意義について研究した例はない。

セイヨウナシにおいても、発育中にデンプンが蓄積し、成熟に伴い減少する。そのため、成熟期のデンプン含量(ヨード反応)が収穫適期の指標との一つになっている。セイヨウナシのデンプンについては、この観点で研究されたものが大半で、発育期のデンプンの消長などはほとんど研究されていない。ナシ属果実は、セイヨウナシとアジアナシの 2 つに大別され、さらにアジアナシは、ニホンナシとチュウゴクナシに分類される。このアジアナシにおいては果実に含まれるデンプンについては、研究例がない。

2. 研究の目的

セイヨウナシは、デンプンを貯蔵養分として果実に蓄積し、成熟中に可溶性糖へと分解することが知られている。しかし、果実の生育過程において、樹体および果実で、同化産物がどのような消長を示すのかは明らかではない。そこで本研究では、果実成熟期に起こるデンプンの蓄積から代謝へのダイナミックな相転換時に、デンプンや細胞壁成分などの多糖類の解析を行うことにより、この時期に果実内で何が起きているか明らかにする。このデータをもとに、果実成熟期に起こるデンプンの蓄積から代謝へのダイナミックな相転換の生理学的意義を解明する。さらにデンプンを糖に分解する過程には、酵素であるアミラーゼがかかわっているとされているが、セイヨウナシ果実の成熟過程におけるアミラーゼの遺伝子発現に関する報告は少ない。そこで本研究では、それらの遺伝子発現パターンを解析し、デンプン分解との関係を検討した。

3. 研究の方法

平成 28 年度

実験には、山形大学農学部学内圃場植栽の‘パートレット’を供試した。樹上成熟区では、収穫適期 30 日前から収穫適期まで 10 日ごとに、果肉、果梗、果台、結果枝を採取した。収穫適期後は、樹上成熟区、追熟区ともに 4 日ごとに果肉のみ採取した。サンプルは凍結乾燥後、デンプン含量を酵素法により、糖含量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。また、果梗と果台は固定液 (FAA) による組織の固定後、走査型電子顕微鏡を用いてデンプン粒の観察を行った。

平成 29 年度

セイヨウナシの中では例外的に樹上完熟特性を有する‘ミクルマス・ネリス’を供試し、樹上完熟特性を調査した。その結果、樹上成熟区においても、エチレン生成量の増加と、果肉硬度の低下が起こり、4 日目に可食状態に達した。また、樹上成熟区において、果実の落下は 8 日目から増加したことから、樹上においても果実が落下する前に完熟することを確認した。次に、果実の簡易光合成測定装置 (DC ファンでチャンパー内空気を十分に攪拌して CO₂ 濃度変化を一定に保つ) (図 1) を用いて、セイヨウナシの晩生品種である‘ル・レクチエ’における果実発育・成熟中の光合成速度を測定した。

平成 30 年度

実験には、山形大学農学部学内圃場植栽の‘パートレット’を供試した。試験区として樹上成熟区、適期に収穫した果実を 20 で追熟する追熟区、0 で貯蔵する低温区を設け、収穫適期から 4 日ごとに果肉を採取した。サンプルは凍結乾燥後、デンプン含量を酵素法により、糖含量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。また、遺伝子発現は -アミラーゼ遺伝子の中で RNA-seq で発現量の高かった PCP010985, PCP012578, PCP026151, PCP032427 の 4 つの遺伝子についてリアルタイム PCR で解析した。



図 1 簡易光合成測定装置

令和元年度

セイヨウナシ果実では、発育中に蓄積したデンプンが成熟中に分解する。この過程にはアミラーゼが関わっていると考えられているが、そのメカニズムはわかっていない。平成 30 年度に、パートレット果実の樹上成熟区、追熟区、低温貯蔵区を設け、 α -アミラーゼ遺伝子発現の解析を行った。本研究では、 α -アミラーゼに着目し、遺伝子発現の比較を試みた。RNA-seq の実験で遺伝子発現がみられた 31 個の α -アミラーゼ遺伝子の中で、発現量の高かった PCP000852、PCP002127、PCP003881、PCP004080、PCP007121、PCP026720、PCP026721 の 7 つを選択し、リアルタイム PCR で解析した。

4. 研究成果

平成 28 年度

樹上成熟区において、デンプン含量の変動は特に結果枝で大きく、収穫適期 30 日前から 20 日前にかけてデンプン含量が最大 $1.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ まで増加したが、それ以降減少した。また、果台のデンプン含量は、収穫適期 30 日前から 20 日前にかけて増加し、最大で $0.61 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ に達したが、収穫適期にかけて大きく減少した。また、果梗ではデンプンがほとんど蓄積していなかった (図 2)。

樹上成熟区の果肉では、収穫適期までデンプン含量が大きく変動しなかった。一方、追熟区では、果肉のデンプン含量は急激に減少し、収穫 8 日後にはデンプンが消失した (図 3)。

果肉では、収穫適期までソルビトール含量が大きく変動しなかった。しかし、追熟区において、収穫後すみやかにソルビトール含量は減少し、収穫 8 日後には $0.86 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ であった。また、果梗、果台、結果枝のソルビトール含量は、果肉に比べて少なかった (図 3)。

果肉では、樹上成熟区、追熟区ともに、スクロース含量は増加傾向を示した。樹上成熟区では、スクロース含量が増加し続け、16 日目に最大 $1.74 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ まで増加した。一方、追熟区では、収穫後 8 日目までスクロース含量は増加したが、それ以降の変動はわずかであった。また、果梗、果台、そして結果枝のスクロース含量は、果肉に比べて少なかった。

果肉において、樹上成熟区では、試験期間を通してフルクトース含量の変化はわずかであった。しかし、追熟区では、収穫 8 日後から 16 日後にかけて、フルクトース含量は顕著に増加し、収穫 16 日後には $5.8 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ に達した。また、果梗、果台、そして結果枝では、フルクトースがほとんど検出されなかった。

果肉において、樹上成熟区ではグルコース含量に大きな変化はみられなかった。しかし、追熟区では、収穫 4 日後から 16 日後にかけて、グルコース含量が顕著に増加し、収穫 16 日後には $0.93 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \text{FW}$ に達した。また、果梗、果台、そして結果枝のグルコース含量は、果肉に比べて少なかった。

以上の結果から、樹体は自身の生育、および果実へ輸送する同化産物を一時的に貯蔵するために、デンプンを蓄積すること、また、果梗はデンプンの貯蔵器官ではなく、樹体からの転流糖の輸送経路として用いられること、そして、収穫が果肉の炭水化物の代謝を活性化することが示唆された。

平成 29 年度

光合成速度は幼果期に高く、満開 128 日後にはほぼゼロになること、また、この時期に果肉のデンプンは蓄積から代謝への相転換を起こすことが判明した (図 4)。一方で、発育期に光を遮蔽する袋をかけてもデンプン含量に大きさが認められないことから、果実発育後期においては、果皮のクロロフィルは機能していないと考えられた。糖についても、スクロースは収穫期まで増加を続けるものの、フルクトース、グルコース、ソルビトールは満開 128 日後まで増加したのち減少した。これらのことから、満開 128 日後に炭水化物のダイナミックな相転換が起こることが判明した。これまでセイヨウナシ果実発育ならびに成熟中におけるデンプンの消長は果肉で測定した結果が大半であることから、果皮においても同時期に測定した。その結果、果皮のデンプ

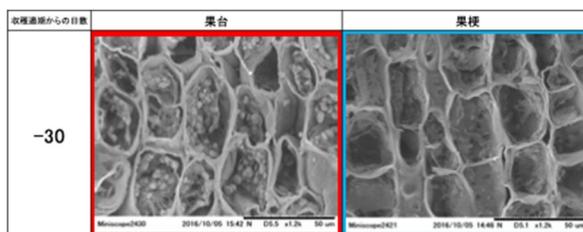


図 2 電子顕微鏡写真(それぞれ左が果台、右が果梗)

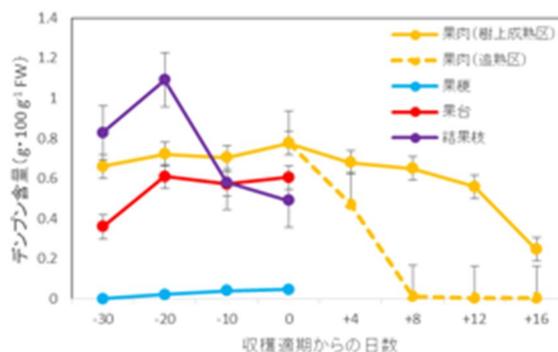


図 3 セイヨウナシ‘パートレット’のデンプン含量の推移. バーは標準誤差を示す.

ン含量は満開 165 日後まで増加を続け、その後減少し、果皮と果肉のデンプン含量の消長パターンは異なることが判明した。

平成 30 年度

その結果、果肉のデンプン含量は、追熟区と低温区ともに減少した。とりわけ追熟区では 12 日目に大きく減少し 16 日目に消失した。これに対して、樹上成熟区では大きな変化はなかった。糖について、総含量は 3 試験区で大きな差はなかった。しかし、樹上成熟区ではソルビトールが減少し、スクロースが増加した。

RNA-seq の結果、50 個のアミラーゼ遺伝子の発現がみられた (表 1)。その中で、 α -アミラーゼ遺伝子は 15 個、 β -アミラーゼ遺伝子は 27 個、イソアミラーゼ遺伝子は 7 個発現していた。発現量を表す RPKM 値において、20 を越えている遺伝子は α -アミラーゼが 4 個、 β -アミラーゼが 11 個、イソアミラーゼが 4 個であった。4 つの α -アミラーゼ遺伝子のうち、PCP026151 は追熟区と低温区で発現量が増加し、特に追熟区において 12 日目に顕著に増加した。以上の結果から、セイヨウナシ果実では収穫後にデンプンが分解し、 α -アミラーゼ遺伝子である PCP026151 の発現量が 12 日目以降で急激に増加することが判明した。このことから、PCP026151 が追熟後期のデンプン分解にかかわっていることが示唆された。

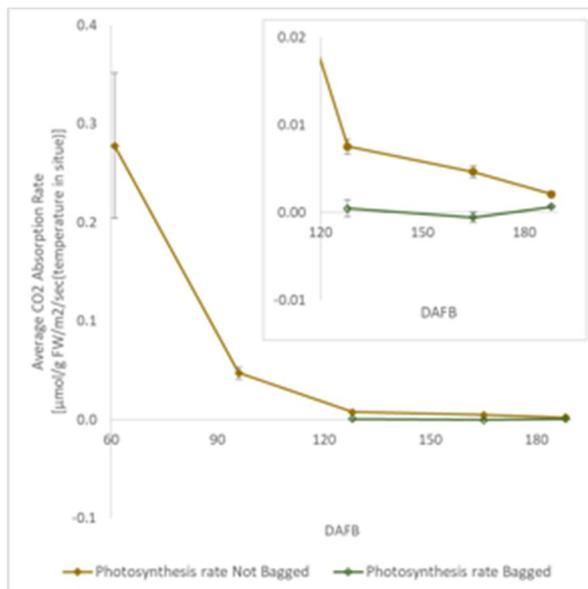


図 4 セイヨウナシ果実における発育中の光合成速度の変化

表 1. セイヨウナシ 'バートレット' の収穫後 1 日目、樹上成熟区 1 日目と 8 日目における遺伝子発現量。(RPKM=Reads per kilobase of exon per million mapped reads.)

Gene ID	RPKM (ave.)			Descriptions
	OFF1d	ON1d	ON8d	
PCP016987	7.5	7.0	5.8	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 3, chloroplastic/amyloplastic
PCP007947	0.0	0.0	0.0	Alpha-amylase
PCP010985	20.2	29.4	32.2	Alpha-amylase
PCP010988	2.4	3.2	4.0	Alpha-amylase
PCP012578	51.2	59.8	49.9	Alpha-amylase
PCP032445	5.2	7.0	6.7	Alpha-amylase
PCP032446	5.8	8.5	8.9	Alpha-amylase
PCP036144	0.0	0.1	0.0	Alpha-amylase
PCP026151	35.4	28.4	28.9	Alpha-amylase 3, chloroplastic
PCP026564	8.7	7.4	8.8	Alpha-amylase 3, chloroplastic
PCP031129	5.6	4.6	4.9	Alpha-amylase 3, chloroplastic
PCP032427	472.2	365.2	326.8	Alpha-amylase 3, chloroplastic
PCP010987	0.0	0.0	0.2	Alpha-amylase isozyme 3C
PCP010986	0.1	0.0	0.0	Alpha-amylase isozyme 3D
PCP019527	9.5	11.1	16.2	Probable alpha-amylase 2
PCP025759	6.7	7.5	6.3	Probable alpha-amylase 2
PCP007121	48.5	67.6	46.5	Beta-amylase
PCP000852	55.6	27.0	49.4	Beta-amylase 1, chloroplastic
PCP004080	27.3	27.0	22.2	Beta-amylase 1, chloroplastic
PCP014412	22.2	25.7	17.8	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP026721	16.3	15.1	13.2	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP027424	0.0	0.0	0.0	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP028548	3.7	3.7	4.2	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP032067	19.7	29.4	19.2	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP037058	11.3	16.6	11.7	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP042164	17.3	21.1	15.4	Beta-amylase 2, chloroplastic
PCP002127	27.9	25.3	18.6	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP005116	20.8	20.7	19.0	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP009001	12.3	11.3	11.8	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP026535	1.0	1.4	0.9	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP032198	7.6	14.9	11.2	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP032199	0.0	0.0	0.0	Beta-amylase 3, chloroplastic
PCP005464	1.1	1.4	0.7	Beta-amylase 7
PCP009219	5.8	5.6	6.7	Beta-amylase 7
PCP026720	8.8	9.8	10.1	Beta-amylase 7
PCP003881	25.6	19.9	25.4	Beta-amylase 8
PCP012342	0.3	0.4	0.4	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP024492	3.5	3.0	2.5	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP025252	1.6	1.4	1.0	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP028512	16.3	19.5	17.2	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP032051	0.4	0.2	0.2	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP034615	0.0	0.0	0.0	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP036541	1.7	1.8	1.4	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP042706	2.0	1.9	1.8	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP042712	1.1	1.7	1.1	Inactive beta-amylase 4, chloroplastic
PCP013428	167.2	134.9	187.7	Inactive beta-amylase 9
PCP027856	478.9	451.9	697.3	Inactive beta-amylase 9
PCP024929	16.5	18.1	17.3	Isoamylase 1, chloroplastic
PCP034787	3.2	2.3	2.8	Isoamylase 1, chloroplastic
PCP021965	1.3	1.3	1.8	Isoamylase 2, chloroplastic
PCP012762	35.3	26.4	22.3	Isoamylase 3, chloroplastic
PCP013055	62.7	56.5	40.3	Isoamylase 3, chloroplastic
PCP019101	25.9	19.9	19.6	Isoamylase 3, chloroplastic
PCP020256	60.6	47.6	55.8	Isoamylase 3, chloroplastic

令和元年度

セイヨウナシ‘バートレット’果実の α -アミラーゼ遺伝子である PCP000852 と PCP007121 と PCP03881 が追熟区において発現が増大した（図5）。これらはデンプン含量の減少に伴う推移を示したため、追熟区におけるデンプン分解に関わる遺伝子であると考えられる。PCP000852 は特に追熟区で12日目から16日目にかけて発現量が増大した。よって、主に追熟後期のデンプン分解に関わると考えられる。PCP007121 は追熟区で4日目と8日目に高く発現していた。PCP03881 は追熟区で8日目から急激に発現量が増大し、その後減少した。この時期はデンプン分解が急激に開始される時期と一致し、軟化が起こる時期とも一致している。このことから、この遺伝子はデンプン分解が開始される、または急激にデンプンを分解させるのに重要な遺伝子であると考えられる。よって、以上の3つの遺伝子は時期によって交互に発現が増加したことから、PCP07121 が4日目以降のデンプン分解を、PCP03881 が8日目以降の急激なデンプン分解を担い、最後にPCP000852 が発現することで、12日目以降のデンプン分解を行ったと考えられる。

本実験においては、PCP002127 と PCP04080 が低温貯蔵区の4日目において急激に発現量が増加した（図5）。よって、PCP04080 と PCP002127 は低温ストレスに反応して発現したと考えられる。また、RNA-seq 実験で得られた発現量より、PCP04080 が PCP002127 より発現量が高いため、果実中で主に働いているのは PCP04080 であると考えられる。

以上の結果から、デンプンは追熟中ならびに低温貯蔵中に分解するが、 α -アミラーゼ遺伝子の発現は異なることが判明した。このことから、追熟中および低温貯蔵中におけるデンプン分解のメカニズムは異なることが示唆された。

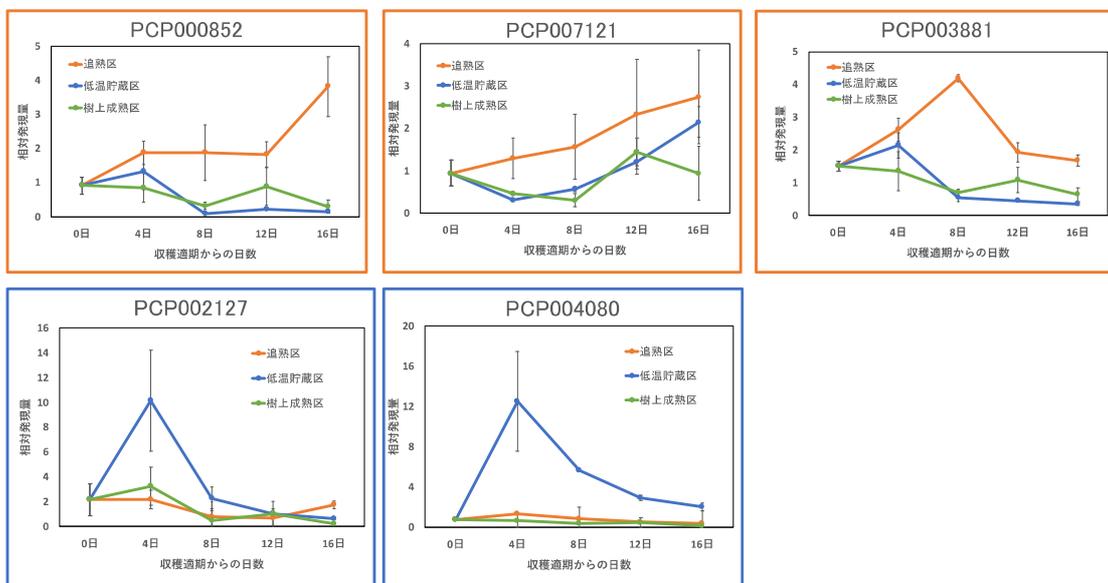


図5 セイヨウナシ‘バートレット’における α -アミラーゼ遺伝子発現量の推移

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Charoenchongsuk Nongluk, Matsumoto Daiki, Itai Akihiro, Murayama Hideki	4. 巻 4
2. 論文標題 Ripening Characteristics and Pigment Changes in Russeted Pear Fruit in Response to Ethylene and 1-MCP	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae4030022	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 Ferrio Juan, Kurosawa Yoko, Wang Mofei, Mori Shigeta	4. 巻 9
2. 論文標題 Hydraulic Constraints to Whole-Tree Water Use and Respiration in Young Cryptomeria Trees under Competition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Forests	6. 最初と最後の頁 449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/f9080449	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Jordi Gine Bordonaba, Violeta Lindo-Garcia, Gemma Echeverria, Gloria Bobo, Hideki Murayama, Christian Larrigaudicre
2. 発表標題 Novel insights on the ripening pattern of 'Blanquilla' pears: a comparison study between on- and off-tree ripened fruit
3. 学会等名 XIII International Pear Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤みそら・西尾聡悟・寺上伸吾・齋藤寿広・山本俊哉・村山秀樹・板井章浩
2. 発表標題 二ホンナシ果実のスクロース含量に関与するD N A マーカーの開発
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中島由葵・山口俊春・金高信吾・虎尾亮・池田隆政・村山秀樹・平山隆志・森泉・松浦恭和・板井章浩
2. 発表標題 自家および他家受粉が自家和合性品種‘おさゴールド’の果実形質に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 章魯ビン・上高原浩・大迫敬・村山秀樹・板井章浩
2. 発表標題 ‘ゴールド二十世紀’と‘Alexandrine Douillard’の果実生育期におけるリグニン含量および組成の解析
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Pamela Ruzigana, Aline Clementine Ingabire, Michiaki Azuma and Hideki Murayama
2. 発表標題 Quality changes of three sweet cherry cultivars during ripening on the tree and after harvest
3. 学会等名 8th International Cherry Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井美希・羽生剛・村山秀樹・児玉基一郎・板井章浩
2. 発表標題 ナシ果実の成熟エチレン生成におけるシステム からシステム への移行関連遺伝子の探索
3. 学会等名 園芸学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 B. Nugraha, N. Bintoro, J. Nugroho, A. Itai, and H. Murayama
2. 発表標題 Effects of 1-Methylcyclopropene and Ethylene Treatment on Ripening Characteristics of the 'Silver Bell' Pears
3. 学会等名 The 2nd International Symposium on Agricultural and Biosystem Engineering (国際学会)
4. 発表年 2016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	板井 章浩 (ITAI AKIHIRO) (10252876)	京都府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24302)	
研究分担者	羽生 剛 (HABU TSUYOSHI) (60335304)	愛媛大学・農学研究科・准教授 (16301)	
研究分担者	森 茂太 (MORI SHIGETA) (60353885)	山形大学・農学部・教授 (11501)	