

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380019

研究課題名（和文）

糖輸送体の網羅的解析をベースとした果実への糖蓄積機構の解明とその応用

研究課題名（英文）

Clarification of sugar accumulation mechanism and the applications of fruits based on comprehensive analysis of sugar transporter

研究代表者：

白武 勝裕 (KATSUHIRO SHIRATAKE)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

研究成果の概要（和文）：

本課題では果実に糖が蓄積する仕組みを「糖輸送体」という分子的観点から明らかにし、トマトをモデル作物とした糖輸送体の網羅解析と、形質転換体作出による果実の高糖度化にチャレンジした。その結果、トマトに20種の糖輸送体を見出し、それらの多くが果実で発現すること、AZT, SFP, VGTが液胞膜に局在することを示した。それらについて、酵母での異種発現やノックダウン形質転換トマトの作出に成功したが、糖輸送活性の検出や果実糖度の変化を見るに至らなかった。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the mechanism of sugar accumulation in fruits, we chose tomato as a model plant and analyzed its sugar transporters comprehensively. We found 20 sugar transporters in tomato and the most of them expressed in fruit. We determined that AZT, SFP and VGT localize in vacuolar membrane. Although we succeeded to produce their transgenic yeasts and tomato plants, we could not see sugar transport activity in the yeasts and change in sugar content in their fruits.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：園芸生理・生化学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：バイオテクノロジー, ポストゲノム, 糖輸送体, 果実, トマト, バラ科果樹

1. 研究開始当初の背景

成熟した果実の糖濃度は1 M近くに達し、糖は果肉細胞の液胞に蓄えられる。果実の細胞（液胞）はどうしてこのように高濃度の糖を蓄積できるのか？果実の他に糖を高濃度に蓄積する植物器官は、テンサイの貯蔵根や

サトウキビの茎などごく一部に限られるが、これらの糖の蓄積機構は分かっていない。

植物の液胞膜には糖を輸送する輸送体の存在が古くから想定されていた。申請者も含め多くの研究者がその遺伝子の単離に取り組んだが、そのほとんどが失敗に終わっている。しかしながら、申請者らの研究を含めた

液胞膜のプロテオーム解析や、ゲノム情報をもとにした網羅的な糖輸送体の解析の結果、最近相次いで液胞の糖輸送体が発見された。

植物の糖輸送体は8つのファミリーに分かれ、細胞のどの膜に局在するのか、またどのような糖を輸送するのかが明らかにされつつある。しかしながらそれらの解析はシロイヌナズナやイネが中心であり、高濃度に糖を蓄積する果実での研究はわずかであり、報告されているものも単に遺伝子の発現解析を行ったに過ぎない。

我々は既に、バラ科果樹（セイヨウナシおよびリンゴ）とトマトを材料に、全ての糖輸送体ファミリーを網羅する形で、遺伝子のクローニングを進めており、3種の液胞膜の糖輸送体候補を見出している。PLTファミリーについては、それらがバラ科果樹の転流糖であるソルビトールを輸送し、師部ローディングに関わることを発表した。しかしながらPLTファミリー以外の糖輸送体の解析はまだ途中であり、本課題においてそれらの生理学的・生化学的機能解析を進めるとともに、形質転換体作出による果実の高糖度化の道を探る必要がある。

2. 研究の目的

本課題では果実に糖が蓄積する仕組みを「糖輸送体」という分子的観点から明らかにし、また形質転換体作出による果実の高糖度化にチャレンジする。

まず、本研究では果実の糖蓄積に関わる糖輸送体の全容を明らかにするために、トマトをモデル作物として8つの糖輸送体ファミリーについて、トマト果実で発現する遺伝子をそれぞれ複数種クローニングする。一方、バラ科果樹はソルビトールという特殊な糖を転流糖とするため、ソルビトールの輸送を担う輸送体に着目し、いくつかの遺伝子の追加を図る。

次にクローニングした糖輸送体について、以下の生化学的解析を進める。クローニングした糖輸送体がどの器官、組織、成長ステージで発現するのかを明らかにし、果実の糖蓄積に関係する輸送体を洗い出す。一方で、酵母などの異種発現系を用いて糖輸送活性を測定し、それぞれの輸送体の輸送基質となる糖を特定する。さらに、GFP融合タンパク質の発現により、糖輸送体タンパク質が細胞のどの膜系で発現しているのか（液胞に局在するのか否か）を明らかにする。糖輸送体がいづれ、どこで発現し、何を輸送しているかが明らかになれば、各輸送体の生理機能が推測できるようになる。

さらに上記の実験で果実への糖蓄積に関連が深いと考えられた輸送体について、トマトとセイヨウナシで形質転換体を作成する。

発現抑制による糖輸送体の糖蓄積への貢献度の確認と、過剰発現による果実の高糖度化を試みる。これらの結果から、どの糖輸送体が高糖度化に重要であるのかが明らかになり、さらに高糖度系統（品種や栽培環境）と低糖度系統における各遺伝子の発現差異を比較すれば、糖輸送体遺伝子をマーカーとした育種も可能となるかもしれない。

3. 研究の方法

(1) 糖輸送体遺伝子のクローニング

トマトに関しては、かずさDNA研究所の完全長ESTデータベースから糖輸送体クローンの譲渡を受ける。データベースにないトマトの糖輸送体とバラ科果樹の糖輸送体は、RT-PCRとRACE法によりクローニングする。トマトは8つの糖輸送体ファミリーについて、それぞれ2種類以上のクローンを得る。これらは、GATEWAYシステムのベクターへサブクローニングして以下の実験に用いる。

(2) 生化学的解析

①遺伝子発現解析：遺伝子特異的プライマーを作製し、半定量的RT-PCRにより各糖輸送体遺伝子の、器官別・組織別・成長ステージ別の発現を明らかにする。

②細胞内局在：GATEWAYからGFP融合タンパク質発現ベクターに遺伝子进行し、シロイヌナズナ培養細胞またはタマネギ表皮細胞に、PEG法またはボンバードメント法により導入する。GFP-糖輸送体融合タンパク質の蛍光を蛍光顕微鏡または共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

③糖輸送活性：GATEWAYから酵母発現ベクターに遺伝子进行し、酵母に導入する。その酵母へのRIラベルした糖の取り込み量を測定し、糖輸送活性とする。酵母の液胞膜に糖輸送体が発現した場合には、液胞膜小胞を単離した後に、糖輸送活性を測定する。

(3) 形質転換体の作出

既に解析を進めている糖輸送体を中心に形質転換ベクターを構築し、トマトに形質転換体する。シビアな表現型を観察するために、全身で強い発現を示すカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター（CaMV35S）を用い、過剰発現とRNAi法による発現抑制を行う。

4. 研究成果

(1) 糖輸送体遺伝子のクローニング

かずさ DNA 研究所が構築したトマト完全長 cDNA データベースに見出した全ての糖輸送体クローンの塩基配列を決定した。それらは、SUT ファミリー3 種, STP ファミリー5 種, PLT ファミリー1 種, ITR ファミリー1 種, pGlcT ファミリー3 種, AZT ファミリー2 種, SFP ファミリー3 種, VGT ファミリー2 種の合計 20 種であった (図 1)。

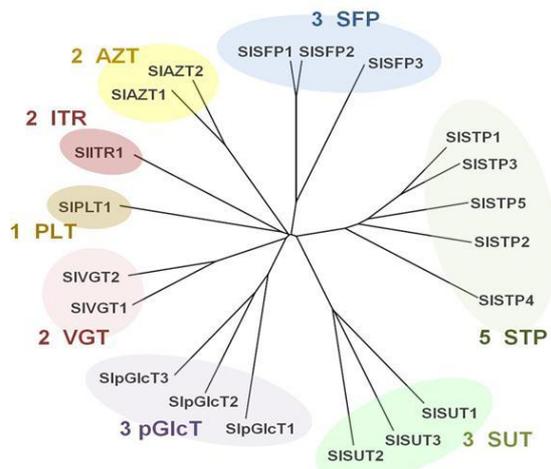


図 1. トマト EST に見出した 20 種の糖輸送体

(2) 生化学的解析

①遺伝子発現解析：遺伝子特異的プライマーを作製し、半定量的 RT-PCR により各糖輸送体遺伝子の発現を明らかにした (図 2)。

その結果、多くの分子種が果実で発現しており、多くの糖輸送体が協調して、果実の成長や糖蓄積を支えていることが明らかとなった。液胞膜局在が推定されている SIAZT2 は、果実のみで発現しており、特に興味深い分子として特定された。また SISTP5 は花特異的に発現するなど、特別な器官・組織でのみ発現する分子も明らかとなった。

②細胞内局在： AZT ファミリー, SFP ファミリー, VGT ファミリーと GFP の融合タンパク質を発現させるためのベクターを構築し、タマネギ表皮細胞へボンバードメント法で導入し、焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、いずれでも GFP の蛍光が核を避けるようにして液胞膜で観察されたことから、AZT ファミリー, SFP ファミリー, VGT ファミリーが液胞膜の糖輸送であることが示された。

③糖輸送活性：液胞膜局在が示された AZT ファミリー, SFP ファミリー, VGT ファミリーを酵母発現ベクターに移し、酵母への導入

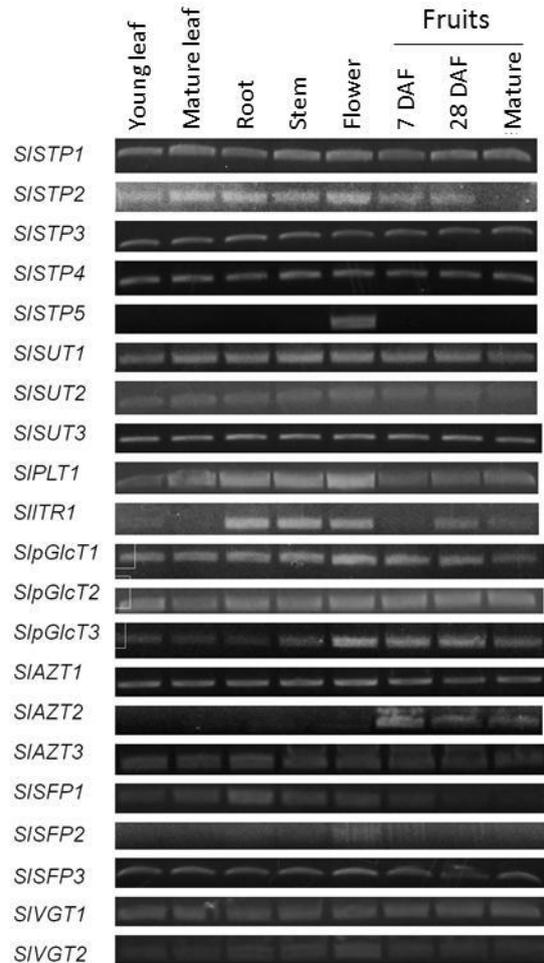


図 2. トマト 20 種の糖輸送体の器官別発現

を試みた。当初、主要な糖輸送体遺伝子が欠損した酵母 LBY416 株に導入して糖輸送活性の測定を試みたが、バックグラウンドが高く解析できないことが明らかとなった。このため、ほとんど全ての糖輸送体遺伝子が欠損している酵母 EBY VW4000 株を取り寄せて、トマトの糖輸送体の発現を試みた。その結果、トマトの糖輸送体と GFP の融合タンパク質が、酵母の内膜系に発現していることが確認できたが、それら導入酵母における糖輸送活性の検出には至らなかった。

(3) 形質転換体の作出

SFP ファミリーと VGT ファミリーをノックダウンするための RNAi カセットを CaMV35 プロモーター下に連結した植物形質転換用ベクターを構築し、トマト‘マイクロトム’への形質転換を進めた。いくつかの形質転換トマト個体の作出に成功したが、それらの果実の糖度が、野生形植物の果実と有意な差があることは、確認できなかった。

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)

[雑誌論文] (計2件)

①Sekido K, Yamada K, Shiratake K, Fukui H and Matsumoto S (2010) MdMYB alleles responsible for apple skin and flesh color. *Current Topics in Plant Biology*. 11: 17-21. 査読有

② Sutsawat D, Yamada K, Shiratake K, Kanayama Y and Yamaki S (2008) Properties of sorbitol dehydrogenase in strawberry fruit and enhancement of the activity by fructose and auxin. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 77: 318-323. 査読有

[学会発表] (計26件)

①奈島賢児, 山本俊哉, 西谷千佳子, 清水徳朗, 五十鈴川寛司, 高品善, 高橋由信, 花田俊男, 白武勝裕. 果変異セイヨウナシ(南陽E)系統における果実の成長および品質. 園芸学会, 宇都宮大学, 2011年3月20~21日

②及川彰, 大塚貴生, 中林亮, 軸丸裕介, 山口信次郎, 高品善, 五十鈴川寛司, 村山秀樹, 斎藤和季, 白武勝裕. 大果変異セイヨウナシのメタボローム解析メタボローム解析(第2報)経時変化解析. 園芸学会, 宇都宮大学, 2011年3月20~21日

③大塚貴生, 中林亮, 軸丸裕介, 山口信次郎, 高品善, 五十鈴川寛司, 村山秀樹, 斎藤和季, 白武勝裕, 及川彰. セイヨウナシ'ラ・フランス'果実のメタボローム解析. 園芸学会, 宇都宮大学, 2011年3月20~21日

④ Shiratake K, Nashima K, Isuzugawa K, Takashina T, Mori H, Oikawa A Comprehensive study about transporters in fruit and integrated omics project for pear fruit, First Symposium on Omics-based Fruit Tree Molecular Biology and Biotechnology, Wuhan, 18th-21st, October, 2010

⑤及川彰, 大塚貴生, 松田史生, 中林亮, 軸丸裕介, 山口信次郎, 斎藤和季, 白武勝裕. 大果変異セイヨウナシのメタボローム解析. 園芸学会, 大分大学, 2010年9月19~20日

⑥大塚貴生, 中林亮, 松田史生, 軸丸裕介, 山口信次郎, 斎藤和季, 白武勝裕, 及川彰. メタボローム解析による大果変異セイヨウナシに特異的な代謝変化の解明. 園芸学会, 大分大学, 2010年9月19~20日

⑦大塚貴生, 中林亮, 松田史生, 軸丸裕介, 山口信次郎, 斎藤和季, 白武勝裕, 及川彰. メタボローム解析による大果変異セイヨウナシに特異的な代謝変化の解明. メタボロームシンポジウム, 理研 PSC 鶴岡, 2010年9月9日-11日

⑧Shiratake K, Yasuda T, Mori C, Gamano T, Hioki H, Nashima K, Aoki K, Shibata D and Yamaki S. Comprehensive expression analysis of sugar transporters and aquaporins in MicroTom, Dundee, 7th SOL, 5th-9th, September, 2010

⑨Nashima K, Yasuda T, Hioki J, Aoki K, Shibata D and Shiratake K. Comprehensive analysis of sugar transporters in Tomato, Adelaide, IWPMB, 19th-24th September 2010

⑩ Mohammed SA, Nishio S, Shiratake K, Nishiyama M, Kanahama K and Kanayama Y. A physiological role of the tomato V-PPase gene family in fruit development, Lisboa, 28th IHC, 22nd-27th, August, 2010

⑪松浦由布子, 青木孝, 柴田大輔, 金山喜則, 山木昭平, 山田邦夫, 白武勝裕. トマトの有機酸トランスポーターSluDT1. 日本植物生理学会, 熊本大学, 2010年3月18~21日

⑫奈島賢児, 金山喜則, 山田邦夫, 山木昭平, 白武勝裕. リンゴ由来ソルビトール6リン酸脱水素酵素のシロイヌナズナ葉での発現効果(第2報). 園芸学会, 日本大学, 2010年3月21~22日

⑬鈴木哲也, 新川猛, 白武勝裕. カキ品種間の糖組成の違いと糖代謝酵素遺伝子発現との関係. 園芸学会, 日本大学, 2010年3月21~22日

⑭Nashima K, Hioki J, Aoki K, Shibata D, Shiratake K. Novel vacuolar sugar transporter, SISFP, from tomato. ナス科ゲノム国際シンポジウム2010, 東北大学, 2010年3月13~14日

⑮Nashima K, Hioki J, Yasuda T, Aoki, Shibata D and Shiratake K. Analysis of vacuolar sugar transporters in Tomato. GCOE 2009 International Symposium "Explore, Exchange, Innovate", Nagoya, 17th-18th, November, 2009

⑯奈島賢児, 日置淳平, 安田智英, 青木孝, 柴田大輔, 白武勝裕. トマトにおける糖トランスポーターの網羅的解析. 植物膜輸送2009ワークショップ, ラフォーレ修善寺, 2009年

10月1～3日

⑰ Shiratake K, Yasuda T, Hioki J, Nashima K, Aoki K, Shibata D and Yamaki S. Comprehensive expression analysis of sugar transporters in tomato, 9th IPMB Congress, St. Louis, 25th-30th, October, 2009

⑱ 白武勝裕. 花と果実におけるアクアポリンの機能. 園芸学会 (シンポジウム), 秋田大学, 2009年9月26～28日

⑲ 奈島賢児, 金山喜則, 山木昭平, 白武勝裕. リンゴ由来ソルビトール合成・転流・代謝遺伝子のシロイヌナズナにおける発現効果. 園芸学会, 秋田大学, 2009年9月26～28日

松浦由布子, 青木考, 柴田大輔, 山木昭平, 山田邦夫, 白武勝裕. トマトの有機酸トランスporter-SltDT1. 園芸学会, 秋田大学, 2009年9月26～28日

⑳ 白武勝裕, 渡利純也, 福井一輝, 日置淳平, 小八重善裕, 奈島賢児, 山木昭平. バラ科果樹における糖輸送体の機能解析. 果樹バイオテクノロジー研究会, 天童市, 2009年6月25～26日

㉑ 白武勝裕, 水野祐輔, 宮下嘉代子, 森智治, 榊原郁恵, 中川喜夫, 安田拓史, 後藤陽加, 小八重善裕, 且原真木, 篠野静香, 山木昭平. 花と果実におけるアクアポリンの発現・調節と機能. 日本植物生理学会 (シンポジウム), 名古屋大学, 2009年3月21～24日

㉒ 松浦由布子, 青木考, 柴田大輔, 山木昭平, 山田邦夫, 白武勝裕. トマトの有機酸トランスporter-SltDT1の解析. 園芸学会, 三重大学, 2008年9月26日～28日

㉓ 奈島賢児, 青木功, 柴田大輔, 山田邦夫, 白武勝裕. 液胞膜局在と推定されるトマト糖輸送体 SIVGT の解析. 園芸学会, 三重大学, 2008年9月26日～28日

㉔ Morimoto R, Kumagai S, Amemiya T, Kanayama Y, Yamaki Sand and Shiratake K. Property of fruit-specific 2A11 promoter from tomato and its effect on anti-sense transformation of V-ATPase, FESPB2008, Tampere, 17th-22nd, August, 2008

㉕ Nashima K, Kanayama Y, Yamaki S and Shiratake K. Over-expression of apple sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis leaves, FESPB2008, Tampere, 17th-22nd, August, 2008

〔図書〕 (計1件)

① Shiratake, K. (2008) Sugar and polyol transporters in plants. In Plant Membrane And Vacuolar Transporters. Edited by Jaiwal, P. K., Singh R. P. and Dhankher, O. P. pp. 239-266, CAB International, Oxfordshire, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白武 勝裕 (KATSUHIRO SHIRATAKE)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号: 90303586

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし