

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20580025

研究課題名（和文） バラ科果樹におけるソルビトールの果実品質決定メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanism of determining fruit quality with sorbitol in the Rosaceae

研究代表者

鈴木康生 (SUZUKI YASUO)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：30335426

研究成果の概要（和文）：

スクロースとともにソルビトールを転流糖として用いるバラ科果樹には、一般的な植物と異なる、特有の糖による遺伝子発現制御機構が存在することが示唆された。また、ソルビトールの合成能が抑制されたリンゴの形質転換体の葉を材料に行ったマイクロアレイによる網羅的解析から、ソルビトールにより発現が調節される遺伝子群が同定され、バラ科果樹におけるソルビトールの役割を理解する上での新たな手掛かりが得られた。

研究成果の概要（英文）：

It is suggested that in the Roseceae, which utilizes sorbitol as well as sucrose as translocated sugars, there is a specific regulatory mechanism of gene expression with sugars, differing from common plants. With comprehensive analysis by microarray using leaves of transgenic apple in which sorbitol synthesis was suppressed, genes regulated by sorbitol were identified, which provides new clues to understand roles of sorbitol in the Rosaceae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：園芸生理学

科研費の分科・細目：農学・園芸学・造園学

キーワード：バラ科果樹、ソルビトール、糖シグナル、S6PDH、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

バラ科果樹では、シュクロースとともにソルビトールが主要な光合成産物として合成され、ソース器官である葉から、果実などのシンク器官へ転流する。ソース器官におけるソルビトール合成のキー酵素は NADP-ソルビトール 6 リン酸脱水素酵素 (S6PDH) であり、シンク器官におけるソルビトール分解のキー酵素は NAD-ソルビトール脱水素酵素 (SDH) であり、ソルビトール代謝の骨格を

担っている。また近年、ソルビトールの輸送体タンパク質が同定され、その輸送機構も解明されつつある。

バラ科果樹にはシュクロースに加えソルビトールが転流糖として存在するが、ソルビトールは果実の甘味や酸味などの味やみづ症の発生に影響を与え、果実の品質を決定づけるファクターとして働く。すなわち、S6PDH を抑制した形質転換体 (GSA04) では葉におけるソルビトールのスクロースに

対する割合は、コントロールの 3.4 から 0.2 へと減少した。その結果、形質転換体の果実の可溶性固形物は 10%程度多くなり、リンゴ酸含量は 2/3 に減少し、甘酸比が高くなり甘味が増した。また、果実内の SDH の酵素活性は低くなり、果実の炭水化物の代謝にも影響を与えていた。

## 2. 研究の目的

ソルビトールの代謝経路は明らかになる一方で、その制御機構についてはまったく未解明である。また、ソルビトールの役割についてもどのようにして果実品質を決定づけるのかについてはわからない。本研究では、ソルビトールを合成する酵素の調節機構と、その結果変動するソルビトールレベルに調節される遺伝子発現等の機構の概要を明らかにし、ソルビトールがバラ科果樹の生理にいかにかかわり、その結果果実品質にどのように影響を与えるのかを分子レベルで明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) ソルビトールによる糖代謝酵素の発現制御の解明

ビワの葉-葉柄組織に、各濃度のソルビトール、シュクロースなどの糖処理を行い、2 日間インキュベートした後、ホットボロート法により RNA を抽出した。S6PDH、SPS、ADP グルコースピロホスホラーゼ (ADPGPPase) の遺伝子発現レベルの変化をリアルタイム PCR 法により調べた。内部標準にはアクチンをもちいた。リアルタイム PCR を行うに先立って、ビワの S6PDH、SPS、ADPGPPase、アクチンの cDNA の塩基配列を決定した。

### (2) ソルビトールにより発現が制御される遺伝子の網羅的解析

ソルビトールの合成能が抑制されたリンゴの形質転換体 (GSS78、GSA04) 及び非形質転換体 (コントロール) の葉を材料に、ソルビトールにより発現が制御される遺伝子の網羅的解析を、マイクロアレイにより行った。リンゴの形質転換体はカリフォルニア大学デービス校の実験圃場で栽培されている成木をもちいた。マイクロアレイは、NCBI のホームページ

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より公開されているリンゴの 23,731 個のユニジーンを主に配置したカスタムアレイを用いた。マイクロアレイにより得られたデータは Subio Platform をもちいて解析した。GO 解析は BLAST2GO、酵素マッピングは KEGG により行った。

## 4. 研究成果

### (1) ソルビトールによる糖代謝酵素の発現

### 制御の解明

ビワの切断葉-葉柄を様々な濃度の糖水溶液で処理した後、遺伝子発現解析を RT-PCR で行った。ソルビトールとスクロースの S6PDH 遺伝子の発現に及ぼす影響が図 1 に示

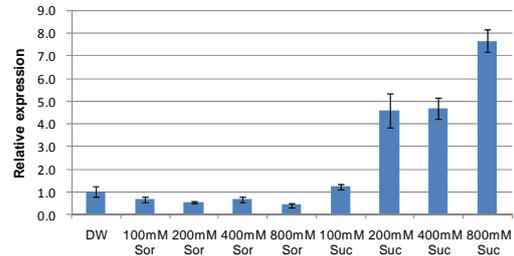


図1. ソルビトール及びスクロース処理した際のS6PDH転写産物のリアルタイムPCR解析。

した。S6PDH の転写産物のレベルはソルビトールにより減少し、800 mM ソルビトールを処理したときのレベルは、コントロールに比べ40%ほどであった。一方、S6PDH の転写産物のレベルはスクロース処理により増加した。200 mM 以上のスクロース処理で転写産物のレベルは著しく増加し、800mM ではコントロールのおよそ 7.5 倍であった。SPS の転写産物のレベルは 200 mM 以上のスクロース処理で著しく減少した。800 mM スクロース処理したときのレベルはコントロールの 10%ほどであった。ソルビトールが発現レベルに及ぼす影響はスクロースほどではなかった。ADPGPPase の転写産物のレベルは、ソルビトール及びスクロース処理により減少した。800 mM のソルビトール及びスクロース処理した際の転写産物のレベルはコントロールの 30%ほどであった。ソルビトール合成のキレート酵素である S6PDH の転写産物のレベルは、ソルビトールにより減少した。ソース葉に存在するソルビトールが、それ以上ソルビトールを合成させないために S6PDH を負に制御するとなると、このことは道理にかなっていると考えられる。興味深いことに、スクロースは S6PDH の転写レベルを増加させた。これらの結果は、バラ科果樹のソース器官にはソルビトールの割合を多く保つための機構が存在すると考えられ、このことからソルビトールが重要な役割をもっていると示唆された。

### (2) ソルビトールにより発現が制御される遺伝子の同定

ソルビトール合成能を抑制したリンゴの形質転換体を材料に、cDNA マイクロアレイによる、ソルビトールにより発現が制御される遺伝子の網羅的解析を行った。マイクロアレイは、主に NCBI のホームページより公開されているリンゴ (*Malus x domestica*) の 23,731 個のユニジーン (UniGene) を配置したカスタムアレイを用いた。材料には、非形質転換体と、ソルビトール 6 リン酸脱水素酵

素 (S6PDH) のアンチセンス遺伝子を導入した形質転換体 (GSS78 及び GSA04) の成葉をもちいた。

その結果、GSA04 では非形質転換体と比べ有意に 2 倍以上発現が減少した遺伝子が 138

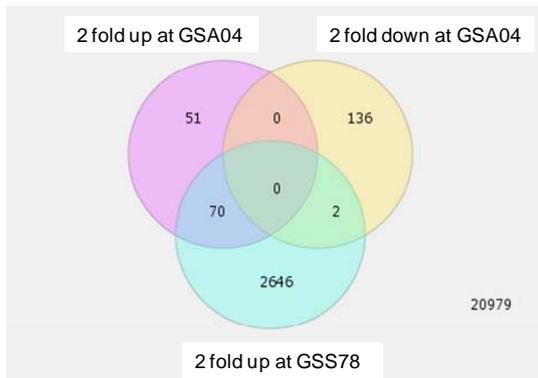


図2. ベン図。リンゴユニジーンを配したカスタムアレイにおいて、2倍以上変動のあった遺伝子数。2 fold up at GSA04 (GSA04で2倍以上発現が増加した遺伝子)、2 fold down at GSA04 (GSA04で2倍以上発現が減少した遺伝子)、2 fold up at GSS78 (GSS78で2倍以上発現が増加した遺伝子)。

個、2 倍以上発現が増加した遺伝子が 121 個検出された (図 2、3)。GSA78 では 2 倍以上発現が減少した遺伝子が 2687 個検出され、

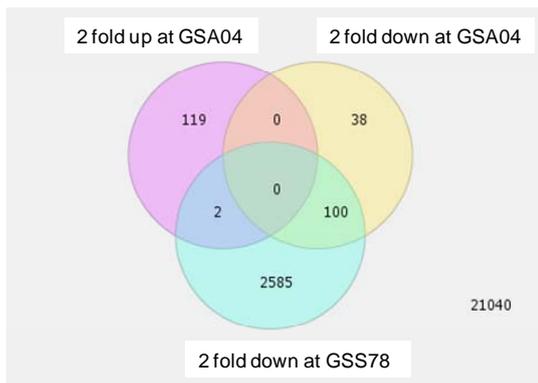


図3. ベン図。リンゴユニジーンを配したカスタムアレイにおいて、2倍以上変動のあった遺伝子数。2 fold up at GSA04 (GSA04で2倍以上発現が増加した遺伝子)、2 fold down at GSA04 (GSA04で2倍以上発現が減少した遺伝子)、2 fold down at GSS78 (GSS78で2倍以上発現が減少した遺伝子)。

うち 100 個が GSA04 においても発現の減少がみとめられた。また、2 倍以上発現が増加した遺伝子は 2718 個検出され、うち 70 個が GSA04 においても発現の増加がみとめられた。これらの遺伝子が直接的または間接的にソルビトールにより発現が制御される遺伝子と考えられた。

Gene ontology 解析をおこなったところ、“Biological process”において、GSA04 で発現が減少した遺伝子、すなわちソルビトールにより発現が正に制御される遺伝子では “cellular response to stimulus”、“oxidation reduction”、“regulation of transcription”、“anatomical structure development”、“response to stress”、“multicellular organismal development”、“protein metabolic process”、“regulation

of biological quality”、“response to hormone stimulus”、“response to carboxylic acid metabolic process”、“response to abiotic stimulus”、“signaling”に含まれる遺伝子群の変動が見出され、変動が大きい遺伝子については、ソルビトール代謝に関する遺伝子を除き、機能不明のものが多く存在した (図 4)。

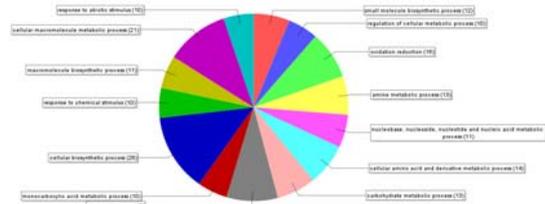


図5. GSA04で発現が増加した遺伝子群のBiological processのGO term分布。

GSA04 で発現が増加した遺伝子、すなわちソルビトールにより発現が負に制御される遺伝子では “small molecule biosynthetic process”、“regulation of cellular metabolic process”、“oxidation reduction”、“amine metabolic process”、“nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process”、“cellular amino acid and derivative metabolic process”、“carbohydrate metabolic process”、“response to stress”、“monocarboxylic acid metabolic process”、“cellular biosynthetic process”、“response to chemical stimulus”、“macromolecule biosynthetic process”、“cellular macromolecule metabolic process”、“response to abiotic stimulus”、に含まれる遺伝子群の変動が見出され、変動が大きい遺伝子についてみると Response to stress に含まれる遺伝子が比較的多かった (図 5)。

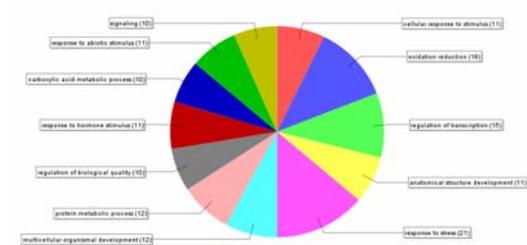


図4. GSA04で発現が減少した遺伝子群のBiological processのGO term分布。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 鈴木康生・寺井弘文・Abhaya Dandekar (2011) パラ科果樹におけるソルビトール 6 リン酸脱水素酵素遺伝子の発現に及ぼす糖

の影響. 第 52 回日本植物生理学会年会 (仙台).

②Suzuki, Y.; Terai H.; Dandekar A. (2010)  
Sucrose induces expression of  
Sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene  
in source leaves of loquat. 28th  
International Horticultural Congress  
(Lisbon, Portugal).

[図書] (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木康生 (SUZUKI YASUO)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 30335426