

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06002

研究課題名(和文) サツマイモの食味に影響する糖代謝制御機構の解明

研究課題名(英文) Studies on the mechanism controlling the sugar metabolism in sweet potato storage roots

研究代表者

坂本 知昭 (Sakamoto, Tomoaki)

石川県立大学・生物資源環境学部・准教授

研究者番号：00345183

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)：低温貯蔵期間中の糖含量の変化を経時的に調査したところ、スクロース含量の増加は認められたが顕著な品種間差は認められなかった。一方、新たに高温処理でもスクロース含量の増加が確認された。低温処理でスクロース含量が1.4倍になるまで約2週間、一般的な貯蔵温度では20日掛かるのに対し、高温処理では12時間しか要しなかった。高温処理塊根内の酵素活性を比較したところ、SPS活性は上昇したのに対し、AINV活性は変化が認められなかった。この結果から高温処理と低温処理はともにスクロースが蓄積したが、前者はスクロース合成が促進され、後者ではスクロース分解が抑制されており、全く異なる現象であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国におけるサツマイモ消費の半分は食用で、良食味であることが消費拡大に重要である。サツマイモは甘味の強さが求められるため、塊根の高糖度化は重要な研究テーマである。本研究では塊根を高温処理することでスクロース含量を短時間で増加させられることを示した。この現象はスクロース合成の律速酵素であるスクロースリン酸合成酵素の活性上昇によると考えられたが、短時間で同酵素活性が急上昇する報告事例は他にない。今後、高温によりスクロースリン酸合成酵素遺伝子の発現が誘導される転写調節機構を明らかにし、スクロースが蓄積するメカニズムを解明することで、サツマイモ塊根の迅速糖化技術の開発に結びつけられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When the changes in the free sugar content during the cold storage period were investigated over time, an increase in the sucrose content was observed, but no significant difference was observed between the cultivars. On the other hand, it was newly confirmed that the sucrose content increased even with high-temperature treatment. It took about 2 weeks to increase the sucrose content by a factor of 1.4 with the low temperature treatment and 20 days at the typical storage temperature, whereas with the high temperature treatment it took only 12 hours. SPS activity increased, but AINV activity did not change in the high-temperature-treated tuberous roots. From these results, it was concluded that both the high temperature treatment and the low temperature treatment accumulated sucrose, but the former promoted sucrose synthesis, while the latter inhibited sucrose decomposition.

研究分野：作物生理学

キーワード：サツマイモ スクロース スクロースリン酸合成酵素 インベルターゼ 貯蔵温度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国におけるサツマイモ消費量の約半分は生食用であり、加工食品用を含めると約6割が食用に供されている。この傾向は過去20年以上続いているが、主食には位置づけられていないため、良食味であることが食用サツマイモの消費拡大に特に重要であると指摘されている。

サツマイモの食味に影響する主要因は加熱調理後の肉質と甘味である。このうち肉質は、水分が少なくホクホクした食感の粉質と、水分が多くしっとりした食感の粘質、および両者の中間質に大別される。粉質と粘質の違いにはデンプン含有率や細胞壁多糖類の構成、デンプン分解酵素の活性などが関与しているとされるが、肉質の形成要因やその制御機構については未解明の部分が多い。以前は消費者の嗜好が粉質から中間質の品種に偏っていたが、「安納いも」が火付け役になった平成の焼き芋ブーム以降は粘質品種も評価されるようになった。現在ではそれぞれの肉質に消費者の嗜好が分かれている反面、肉質に関わらず甘味の強い品種が求められているため、塊根の高糖度化は重要な研究テーマとなっている。

サツマイモ塊根にはグルコース、フルクトース、スクロース、マルトースの4種の遊離糖が含まれており、これらの含量とバランスにより甘味が決まる。このうちマルトースは加熱調理の過程でデンプンが分解されることにより生じることから、デンプンの糊化特性や塊根に内在する α -アミラーゼの熱安定性などが含量に影響すると考えられている。一方、グルコース、フルクトース、スクロース含量は収穫後の貯蔵条件や期間によって変化することがあり、それぞれの増減やその程度は品種により異なる。したがってサツマイモ塊根の糖代謝は、貯蔵環境条件への応答性も含めて、遺伝的に制御されていると考えることができる。

2. 研究の目的

本研究ではサツマイモ塊根における糖代謝はどのように制御されているのかを解明するため、貯蔵中の糖代謝に関わる全ての酵素を遺伝子レベルで同定し、それぞれの生化学的機能を明らかにした上で、それら酵素の遺伝子発現や活性制御に関わる調節因子を探索し、その制御機構を明らかにすることを目的とした。

サツマイモ塊根に含まれる4種の還元糖のうち、マルトースは2分子のグルコースがグリコシド結合した二糖類で、多数のグルコース分子がグリコシド結合で重合したデンプンが、加熱過程で α -アミラーゼにより分解されることにより生じ、加熱後は最も含量が多くなる。そのためマルトース含量に影響する要因の研究は比較的進んでおり、塊根に含まれるデンプンの糊化特性や α -アミラーゼの熱安定性と関連が深いことや、栽培時の地温や窒素施肥量が影響することが報告されている。一方、ヒトが感じる各遊離糖の相対的な甘さは温度によって異なり、例えば40℃における相対強度は、フルクトース:1、グルコース:0.55、スクロース:1、マルトース:0.35とされる。したがって甘味の強弱には、マルトース含量の変化よりフルクトースとスクロース含量の変化の方が強く影響すると言える。

マルトース以外の3種の還元糖含量は加熱による影響をほとんど受けないが、それ以外の要因としては、長期間の貯蔵や低温遭遇がスクロース含量を増加させる例が報告されている程度である。これは一般的にサツマイモの貯蔵性が皮色を含めた外観品質の維持と腐敗の発生程度で評価され、糖含量を含めた塊根成分の変化はあまり重視されてこなかったためと推測される。しかし収穫前の塊根細胞では、貯蔵炭水化物としてのデンプンがアミロプラスト内で盛んに合成されており、細胞質でスクロースを合成し液胞等に蓄積させることを同時に進めるのは生理学的に難しいと考えられる。そこで塊根内のスクロース含量等を大幅に高めるためには、収穫

後の塊根においてデンプンの分解を含めた糖代謝を利用することが有効であると考えた。

サツマイモ品種「高系 14 号」に対する低温処理がスクロース分解酵素の遺伝子発現を抑制し、分解酵素の活性が低下することでスクロースが蓄積することを示した。しかし熱帯中南米原産のサツマイモは低温障害により腐敗が発生し易く、低温を利用した糖化促進技術は実用化に至っていない。そこでサツマイモ塊根における糖代謝はどのように制御されているのかを明らかにすれば、例えばスクロース分解酵素の遺伝子発現を抑制する低温以外の要因を利用した糖化促進技術の開発や、同遺伝子の発現が抑制され易くなる遺伝子配列変異を利用したマーカー育種などが可能となり、そうした画期的な新技術の開発が実現できると考えた。

3. 研究の方法

(1) サツマイモ塊根の調整

本研究では石川県立大学附属農場で栽培した「高系 14 号」、「ベニアズマ」、「兼六」の 3 品種を用いた。基肥として硫酸、過リン酸石灰、硫酸カリをそれぞれ 15、30、15 g m⁻² 畝立て前に施用し、2020 年 5 月 20 日に挿苗、10 月 28 日に収穫した。収穫後は無加温の農場作業舎に設置したコンテナ（縦 36.5 cm、横 52 cm、深さ 30.5 cm）に内包装（厚さ 0.05 mm のポリエチレン袋をコンテナ内に敷き、塊根を入れて上部を折り込み全体を包んだ上で、10 cm × 3 cm 程度開口し換気できる状態とした）の状態に 1 週間貯蔵した。貯蔵試験には各品種 300 g 前後の塊根を用い、貯蔵温度は 8、11、14 の 3 区を設定した。8 区にはバイオショーカー（FKG-370F3、日本フリーザー）を、11、14 区にはバイオメディカルクーラー（UKS-5410DHC、日本フリーザー）を用いた。いずれの処理区も湿度の人為的な制御は行わなかった。貯蔵期間中の温湿度は温湿度データロガー（THMchip、和光純薬工業）を用いて 1 時間ごとに記録し、それぞれ日平均値を算出した。11 月 4 日より貯蔵を始め、開始時および 2、4、6、8、10、12 週後に各区 5 塊根ずつ取り出し、塊根毎に塊根中央部から 5mm コルクボーラーで試料片を 2 本採取、スライスしてから液体窒素で凍結し、-80 で保存した。残りの塊根は 45 分間蒸熱し室温まで放冷後、乾物割合、遊離糖分析、 β -カロテン分析用の試料を取り分けた。また試料採取用塊根とは別に各区 5 塊根を経過観察用に取り分け、各調査日に腐敗の有無を検査するとともに塊根の状態を写真撮影した。

(2) 成分分析

β -カロテンの抽出と分析は Norris ら（1995）の方法に基づき、C18 カラム（Spherisorb 5 μ m ODS2 4.6 × 250 mm, Waters）を装着し、PDA 検出器（SPD-M20A）を備えた HPLC（Prominence LC20A, 島津製作所）を用いて測定した。分析は 35 °C、流速 1.0 mL/分、検出波長 440 nm の条件で行った。溶出液として A 液（90% アセトニトリル、1% トリエチルアミン）および B 液（100% 酢酸エチル）を用意し、サンプル注入後 20 分間で B 液の割合が 0% から 100% へ直線的に増加するように濃度勾配を設定した。カロテノイドの同定は β -カロテン標準品（和光純薬）との保持時間およびスペクトラムの照合のほか、渡辺ら（1999）の HPLC クロマトグラフを参考とした。糖の抽出と分析は Sakamoto ら（2014）の方法に基づき、アミノカラム（Asahipak NH2P-50, Shodex）を装着した HPLC（LXC-10ADvp, 島津製作所）を用いてグルコース、フルクトース、スクロース、マルトース含量を測定した。分析は 40 °C、流速 0.5 mL/分の条件で行い、溶出液には 75% アセトニトリルを用いた。

(3) 遺伝子発現解析

貯蔵中のサツマイモ塊根における発現変動遺伝子を網羅的に解析するため、次世代シーケンシング技術を活用した RNA シーケンス解析を行った。サツマイモの栽培種は同質六倍体で、現状では利用できるレファレンスゲノムがないため、同じく高次倍数性を有するサトウキビで有効性が示されている方法を参考に、PacBio isoform sequencing (Iso-Seq) 法を用いた *de novo* アセンブリにより転写産物データベースを構築した上で、Illumina RNA-Sequencing (RNA-Seq) 法による発現定量解析を行った。Iso-Seq 法の平均リード長は 10kb 以上あるため全長 mRNA を 1 リードでシーケンスでき、多様なアイソフォームが混在する場合でも全てを見分けることができ、アイソフォームごとの発現解析を高精度に実施できる利点がある。

凍結塊根試料を液体窒素下で磨砕した後、0.1 g ずつ 2 本の 1.5 ml チューブに分取し、Fruit-mate for RNA Purification および RNAiso Plus (ともにタカラバイオ) を用いて total RNA を抽出した後、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。Iso-Seq 解析には「兼六」新梢から同様の方法で抽出した total RNA と「兼六」塊根から抽出した total RNA を混合して用いた。遺伝子発現解析では RNA-Seq 解析のほか、定量的 PCR 解析を行った。cDNA は Advantage RT-for-PCR Kit (Clontech) を用いて合成し、定量的 PCR には iCycler iQ Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories) を用いた。

(4) 遺伝子クローニングと機能解析

解析対象遺伝子の完全長 cDNA 配列は Pyrobest DNA polymerase (タカラバイオ) を用いた PCR により増幅した後、pBluescript SK (Stratagene) にクローニングし塩基配列を確認した。組換えタンパク質の発現には pET32a にクローニングし、大腸菌 Rosetta-gamiB (DE3) (Novagen) 内で発現させた後、TALON Metal Affinity Resins (Clontech) を用いて精製した。精製組換えタンパク質の定量には BCA Protein Assay Kit (Thermo) を用いた。酵素活性の測定は Sakamoto ら (2014) の方法に基づいた。酵母 two-hybrid 解析には Matchmaker Gold Yeast Two-Hybrid System (タカラバイオ) を用いた。精製組換えタンパク質の α -アミラーゼの活性測定には beta-amylase assay kit (Megazyme) を用いた。

4. 研究成果

2020 年度に石川県立大学付属農場で栽培した「高系 14 号」、「ベニアズマ」、「兼六」の 3 品種の塊根を、8、11、14 の 3 条件で貯蔵した。貯蔵開始 0 週後のほか、8 は貯蔵 6 週後まで 2 週毎に 3 回、11 は貯蔵 10 週後まで 5 回、14 は貯蔵 12 週後まで 6 回、各回とも各品種 5 本ずつ用いて RNA 抽出および遊離糖含量の分析を行った。

各温度区における各遊離糖含量の増減は品種により異なった。フルクトースとグルコースはよく似た傾向を示し、「兼六」はいずれの温度区でも貯蔵開始後増加したが、「ベニアズマ」はほとんど増加せず、「高系 14 号」は 11 区と 14 区で増加した。スクロース含量は 3 品種とも 8 区と 11 区で増加したが、14 区ではほとんど増加しなかった。マルトース含量は 3 品種ともいずれの温度区でも減少したが、「兼六」の含量は常に他 2 品種より高かった。

スクロース含量に期待された品種間差が認められなかったこともあり、RNA-Seq 解析では 3 品種間で興味深い違いは見出せなかった。ところが同年に行った別の研究プロジェクトで、サツマイモ塊根に対する高温処理がスクロースを蓄積させる可能性を見出した。そこで 2021 年度は、塊根を 60、40、13 で 0~24 時間処理し、遊離糖含量の変化と糖代謝関連遺伝子の発現を調べた。その結果、13 と 40 処理ではスクロースを始め 3 種の遊離糖含量に変化は認められなかったが、60 処理ではスクロース含量が徐々に増加し、12 時間後には約 1.4 倍に達した。

Iso-Seq解析の結果、スクロース合成の律速酵素であるスクロースリン酸合成酵素 (SPS) 遺伝子は塊根内で2種発現していたが、一方は高温処理により抑制され、もう一方は発現が増加した。尚、大腸菌で発現した組換えSPSタンパク質を用いて酵素活性を調べたところ、高温処理により発現が増加したSPSは高温条件下でも比較的高い活性を維持していた。スクロース分解の主要酵素である酸性インベルターゼ (AINV) 遺伝子3種のうち、1つは高温処理により抑制され、1つは一定、残りの1つは発現が増加した。さらにSPSの活性制御因子14-3-3の遺伝子はIso-Seq解析の結果6種得られ、そのうち2種は高温処理により発現が増加した。

低温によるスクロースの蓄積は主にAINVの活性低下によると考えているが (Sakamotoら 2014)、低温処理でスクロース含量が1.4倍になるまで約2週間、一般的な貯蔵温度である20日掛かる。「合成を促すアプローチ」と比べ「分解を抑えるアプローチ」ではスクロースの蓄積に時間がかかるであろうことは否めない。高温処理塊根では複雑な遺伝子発現パターンが認められ、酵素活性やタンパク質の機能が必ずしも遺伝子発現量の多寡と一致しないことを考え合わせると、高温によりスクロースが蓄積するメカニズムを解明し、迅速糖化技術の開発に結びつけるためには、まず酵素・タンパク質レベルで何が起きているか明確にする必要があると考えられた。

そこで高温処理したサツマイモ塊根内のSPSおよびAINV活性の経時的変化について測定を行ったところ、高温処理した塊根のSPS活性は上昇したのに対しAINV活性は変化が認められなかった。この結果から、高温処理塊根ではSPS活性が上昇した結果スクロースが蓄積したと結論づけられた。サツマイモ塊根の低温処理ではSPS活性の上昇ではなく、AINV遺伝子の発現が抑制された結果AINV活性が低下してスクロースが蓄積した (Sakamotoら 2014)。つまり高温処理と低温処理はともにスクロースが蓄積したが、前者はスクロース合成が促進され、後者ではスクロース分解が抑制されており、全く異なる現象であることが明らかとなった。

SPSを結合標的としその活性を制御する14-3-3候補として、Iso-Seq解析の結果6種類の候補配列が得られた。これらが実際にSPSと相互作用しうるか酵母two-hybrid法を用いて検証した結果、2種類のSPSはそれぞれ異なる14-3-3タンパク質と相互作用することを明らかにした。

サツマイモ塊根内でスクロースの合成が促進されて蓄積するためには、塊根内の貯蔵デンプンが分解されて糖が生成される必要がある。この過程に関与していると考えられる α -アミラーゼの候補遺伝子をIso-Seq解析の結果8種類単離し、全長cDNAをクローニングした。各遺伝子発現の器官特異性を明らかにしたほか、一部については大腸菌内で発現させ、アフィニティカラム精製した組換えタンパク質を用いて酵素活性を確認した。

<引用文献>

Norris, S.R., T.R. Barrette and D. DellaPenna (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell* 7: 2139-2149.

渡辺慶一・土岐知久・猪野 誠・廣田才之・高橋文次郎 (1999) サツマイモ塊根の貯蔵中における α -カロテン含量の変化および α -カロテン異性体について. *園学雑* 68: 1044-1046.

Sakamoto, T., D. Masuda, K. Nishimura and Y. Ikeshita (2014) Relationship between invertase gene expression and sucrose concentration in the tuberous roots of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) during cold storage. *J. Hort. Sci. Biotech.* 89: 229-235.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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