

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780244

研究課題名（和文） 牧草の再生時におけるフルクタン分解酵素遺伝子の発現誘導機構の解明

研究課題名（英文） Studies on the transcriptional regulation of fructan exohydrolase genes during regrowth after cutting in forage grasses.

研究代表者

田村 健一 (TAMURA KEN-ICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・酪農研究領域・主任研究員

研究者番号：10414749

研究成果の概要（和文）：刈取り後のチモシーの基部（球茎など）における、再生のためのエネルギー源供給に、フルクタン分解酵素遺伝子である *Pp6-FEH1* が関与することが示唆された。またその遺伝子発現誘導には単少糖含量が関与にした。さらに *Pp6-FEH1* は低温によっても発現誘導されることから、フルクタン分解による凍結保護物質の生成に関与する可能性が示唆された。その発現誘導に関わるプロモータ領域が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：A fructan exohydrolase gene, *Pp6-FEH1* was transcriptionally induced in basal parts of timothy after cutting. This suggests that *Pp6-FEH1* is involved in the energy supply for regrowth after cutting. Glucose and sucrose inhibited the up-regulation of *Pp6-FEH1* transcripts. Transcriptional induction of *Pp6-FEH1* by cold also suggests its involvement in increase of freezing tolerance by producing mono-saccharides known as cryoprotectants. Reporter assay revealed the promoter region involved in the cold induction of timothy *FEH*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：フルクタン、フルクタン分解酵素、再生、チモシー、遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

草地農業における永年性イネ科牧草の飼料作物としての利用体系とは、栄養生長および生殖生長組織の利用（採草あるいは採食）とその再生の循環プロセスであり、再生力はイネ科牧草にとって重要な形質である。寒地型イネ科牧草の多くは光合成産物を可溶性フルクトースポリマーであるフルクタンとして貯蔵するが、採草あるいは採食により、地上部の多くが除かれると、基部組織においてフルクタンが分解され、分解された糖が再

生のエネルギーとして利用されることが知られている。その際、フルクタン分解酵素活性が増加することが報告されているが、その誘導機構に関しては明らかでなかった。

研究代表者はチモシー (*Phleum pratense* L.) からフルクタン分解酵素 (Fructan exohydrolase: FEH) 遺伝子である *PpFEH1* を単離し、その転写発現量が刈取り処理後の幼苗基部組織で数倍程度増加することを明らかにした。これは、これまでの報告にある再生

時のフルクタン分解との関係が推察されるものであり、*FEH* 遺伝子の転写発現誘導の解明がその制御システムを解き明かす鍵であると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究ではチモシーのフルクタン分解酵素遺伝子の発現誘導機構の解明を最終目標として、以下の研究目的を設定した。

(1) 刈取り処理後球茎および低温環境下における *PpFEH1* の転写産物の解析

(2) 再生時チモシーからの *PpFEH1* 以外の新規 *FEH* 遺伝子の単離

(3) *FEH* 遺伝子の発現誘導に関与する物質の探索

(4) *FEH* 遺伝子の発現誘導に関わるシス配列の同定

3. 研究の方法

(1) チモシー成熟植物体について 5 cm の高さで地上部を刈取ったのち、球茎を経時的にサンプリングした。これらについてリアルタイム定量 RT-PCR 法により遺伝子発現量を定量するとともに、フルクタン分解酵素活性の測定、およびフルクタン含量の定量を行った。またチモシー幼苗の基部組織を対象に、低温条件下および越冬前後の屋外 (札幌) における遺伝子発現量などを解析した。

(2) 刈取り処理後のチモシー球茎由来 cDNA を作成し、*Pp6-FEH1* の *FEH* 保存領域由来プライマーを用い、RACE 法により *FEH* ホモログ遺伝子の単離を行った。

(3) チモシー幼苗について刈取り処理後もしくは処理無し幼苗を各種化合物水溶液に移した後にサンプリングを行いリアルタイム定量 RT-PCR をはじめとする解析を行った。

(4) *Pp6-FEH1N* 末端側配列からの Tail-PCR 法により上流配列 (プロモータ配列) の単離を行った。得られた配列について PLACE によるシス配列の探索を行った。推定転写開始点から様々な塩基長のプロモータ配列をレポータ遺伝子としてホタルルシフェラーゼに接続したベクターを作出した。これらのベクターとレファレンスとして CaMV35S プロモータに接続したウミシイタケルシフェラーゼベクターをパーティクルガンによりチモシー幼苗の葉身に共導入し、レポータ活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 刈取り処理後球茎および低温環境下における *PpFEH1* の転写産物の解析

刈取り処理後のチモシー球茎における

Pp6-FEH1 の発現は 3 時間で誘導され、96 時間後には 140 倍に達した (図 1)。一方 3 時間後以降、分解酵素活性の上昇およびフルクタン含量の低下も認められた。*Pp6-FEH1* はフルクタン分解酵素活性を有することから、フルクタンが蓄積されている球茎における刈取り処理後のフルクタン分解に、*Pp6-FEH1* の遺伝子発現誘導が関与していることが示唆された。

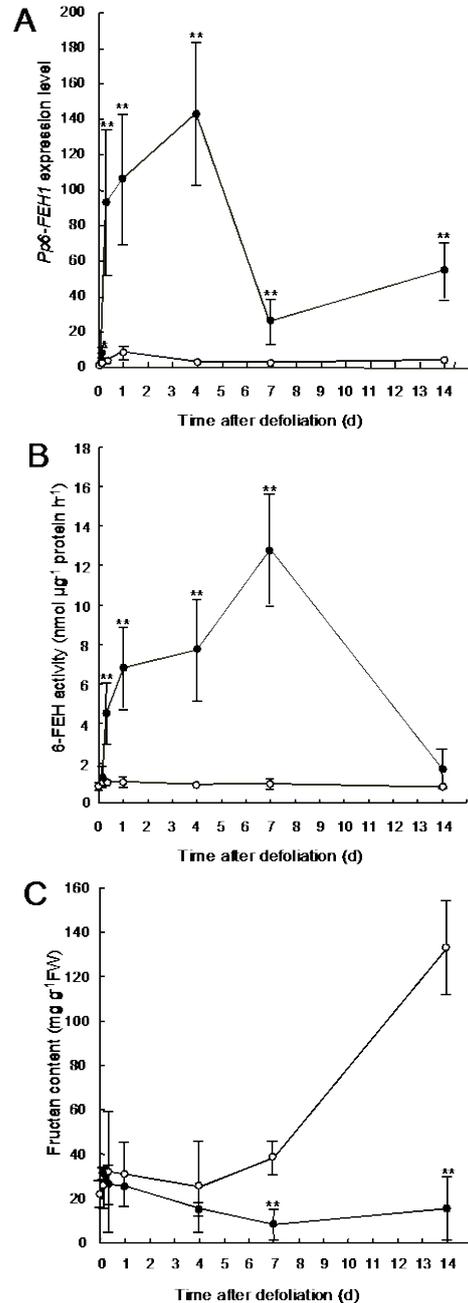


図 1 チモシー球茎における刈取り処理後の *Pp6-FEH1* 発現量 (A)、6-FEH 活性 (B) およびフルクタン含量 (C) ●: 刈取り処理後、○処理無し (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 処理間の比較)

一方、他植物種では FEH 遺伝子の発現が低温により誘導されることが報告されている。*Pp6-FEH1* の発現に対する低温応答を評価した結果、越冬前後の圃場においては、積雪前のマイナス温度期における一過的な発現量の増加、およびフルクトースの増加が認められた。また人工条件下の幼苗において気温を 4℃ から -3℃ に低下させると遺伝子発現量は 3 日で約 40 倍に増加した (図 2)。これらのことから *Pp6-FEH1* はセカンドハードニング (マイナス温度期の低温馴化) において、フルクタン分解により耐凍性に関与することが報告されている単糖を増加させることで耐凍性の向上に寄与している可能性が示唆された。

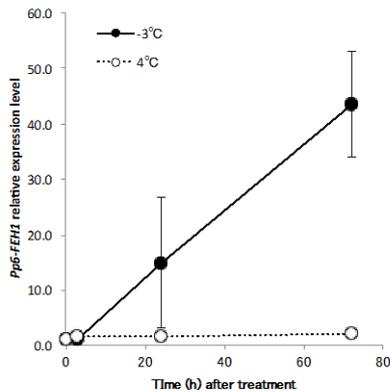


図 2 チモシー幼苗における低温処理後 (4℃→-3℃) の *Pp6-FEH1* 発現量

(2) 再生時チモシーからの *PpFEH1* 以外の新規 FEH 遺伝子の単離

3 種類の *Pp6-FEH1* ホモログを単離した。これらはいずれもアミノ酸レベルで *Pp6-FEH1* と 92% の相同性を示した。3 つの β -フルクトシルトランスフェラーゼ保存領域を有し、またインベルターゼ活性と関連する Asp239 は Met に置換されているなど、配列の面から FEH である可能性が高いと考えられた。一方、3' UTR の相同性は互いに低いことからこれらは *Pp6-FEH1* を含め paralogue の関係にあることが示唆された。

(3) FEH 遺伝子の発現誘導に関与する物質の探索

チモシー幼苗における植物ホルモンの *Pp6-FEH1* 発現量への影響を評価した結果、ABA およびカイネチン処理により発現が誘導されることが明らかとなった。また、FEH 活性を負に制御すると報告のあるグルコースとスクロースの影響を評価した結果、これらの糖の添加により刈取り処理後の *Pp6-FEH1* 発現量増加が有意に抑制された (図 3)。以上よりこれらの物質の増減が *Pp6-FEH1* の遺

伝子発現を制御している可能性が示唆された。しかしながら植物ホルモンについては用いた濃度が植物体内の濃度に比べ非常に高いためさらなる検討が必要と考えられる。また単少糖については、再生にともなう単少糖の消費が *Pp6-FEH1* の発現誘導に関与している可能性が考えられる。一方、*Pp6-FEH1* の遺伝子発現誘導におけるリン酸化シグナル伝達経路の関与を明らかにするため、MAP キナーゼ阻害剤である U0126 および PP2K 阻害剤であるオカダ酸を刈取り処理前後のチモシー幼苗に処理したが、*Pp6-FEH1* の発現量に処理の有無による有意な変動は認められなかった。

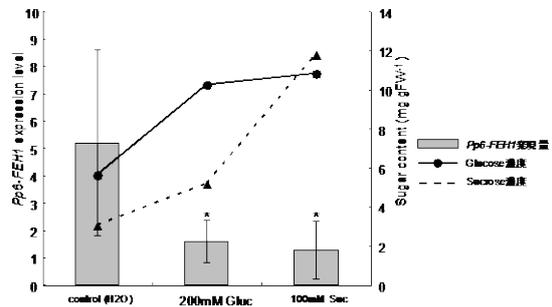


図 3 単少糖の *Pp6-FEH1* 発現量への影響 刈取り処理 3 時間後の *Pp6-FEH1* 発現量 (刈取り処理前を 1 とする相対値, * $p < 0.05$ コントロールとの比較) とグルコース、スクロース濃度

(4) FEH 遺伝子の発現誘導に関わるシス配列の同定

Pp6-FEH1 の N 末端配列からの Tail-PCR により、上流約 2 kbp の 3 種類の配列を取得した。これらは相互に保存性が高く、同一の対立遺伝子の上流配列であると考えられた。シス配列の探索の結果、ABA やサイトカイニンによる誘導、CBF による低温誘導、糖飢餓誘導に関するシス配列などが認められた。このうちの一つの配列について、推定転写開始点からそれぞれ -186, -416, -695 および -1035bp をルシフェラーゼ遺伝子に接続したベクターを構築し、一過的発現によるデュアルレポーターアッセイによりプロモータ活性の評価を行った。打ち込み効率の高かった播種後 16-18 日目の幼苗の第 3 葉を用いた試験の結果、-695bp が最も高い活性を示した (図 4)。また、刈取り後の遺伝子発現を抑制するグルコースの有無による活性の有意差は認められなかった。刈取り処理後発現誘導に関与するプロモータ領域を同定するには、評価に用いる組織を工夫するなどさらに検討が必要であると考えられた。一方、低温 (4℃) 処理を行うと常温 (22℃) と比較し -416, -695 および -1035bp プロモータの活性は約 2 倍に増加し、-186bp では処理間で有意

差は認められなかった(図4)。-186bpと-416bpの間に3つのCRT配列が存在することから、*FEH* 遺伝子の低温誘導には低温誘導性転写因子であるCBFが関与する可能性が示唆された。

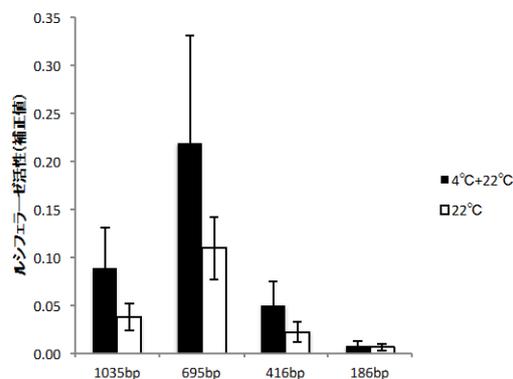


図4 チモシー由来 *FEH* 遺伝子プロモータのレポータ活性と低温処理の関係。低温処理は4°Cで5時間処理した後、22°Cで12時間保持、コントロールは22°Cで17時間保持した後、活性を測定した。

本研究により *Pp6-FEH1* が刈取り後の再生に関与する可能性が示唆され、またその発現変動に関わる物質が同定された。ホモログ遺伝子を含めこれらの遺伝子について、遺伝変異や発現量の変異と再生力の関係を明らかにすることにより、イネ科牧草の再生力の改良に有用な知見が得られると考えられる。また本研究で単離されたプロモータから、発現誘導に関わるシス配列を同定することで、刈取り後の再生力を改良するための分子育種への応用が期待できる。

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)

[雑誌論文] (計2件)

① Tamura K, Sanada Y, Tase K, Komatsu T, Yoshida M, *Pp6-FEH1* encodes an enzyme for degradation of highly polymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*, 査読有, Vol.62, No.10, 2011, pp.3421-3431 DOI:10.1093/jxb/err018

② Yoshida M, Tamura K, Research on fructan in wheat and temperate forage grasses in Japan. *JARQ*, 査読有, Vol.45, No.1, 2011, pp.9-14
http://www.jircas.affrc.go.jp/kankoubutsu/JARQ/Vol_index/45_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 健一 (TAMURA KEN-ICHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・酪農研究領域・主任研究員

研究者番号：10414749

