

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月19日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780029

研究課題名（和文） ゲンチオオリゴ糖による多年生植物の新規休眠制御機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of novel dormancy mechanism in perennials regulated by gentio-oligosaccharides

## 研究代表者

高橋 秀行（TAKAHASHI HIDEYUKI）

公益財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・主任研究員

研究者番号：00455247

研究成果の概要（和文）：本課題では、リンドウの冬期における休眠調節機構の解明を目指した。メタボローム解析により、越冬芽の休眠期にゲンチオオリゴ糖の変動が検出されたことから、本オリゴ糖が休眠調節物質である可能性が見出された。そこで、ゲンチオオリゴ糖の調節及び作用機序について調査した。関連酵素の遺伝子発現と活性測定の結果から、休眠期にインベルターゼが顕著に変動しており、本酵素によってゲンチオオリゴ糖が調節される可能性が示された。さらにターゲットメタボローム解析から、オリゴ糖処理によって特定の代謝経路が活性化される結果が得られたことから、越冬芽の休眠調節にゲンチオオリゴ糖が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Bud dormancy is one of the survival strategies of perennials. Gentians produce overwintering buds, which have strong tolerance to cold, but the mechanisms regulating dormancy are unknown. In this study, we performed metabolome analysis and found that the concentrations of gentio-oligosaccharides were changed during dormancy. We also found the gene expression and activity of invertase were changed in parallel with the gentio-oligosaccharide concentration, implying that the oligosaccharides was regulated by invertase. Furthermore, targeted metabolome revealed that treatment of the oligosaccharides activated some metabolic pathways, indicating that gentio-oligosaccharides may be involved in regulation of dormancy in gentians.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：花卉、植物、リンドウ、メタボローム

## 1. 研究開始当初の背景

休眠は生物の環境適応能力の一つであり、代謝の鎮静化によりエネルギー消費を抑えることで厳しい環境に耐え、至適環境になると蓄えたエネルギーを利用して活動を再開する。すなわち、休眠とは環境に応じて自身のエネルギー代謝を調節する反応である<sup>1)</sup>。植物の場合、休眠時には環境ストレス耐性が付与され、さらに長期間の生存が可能となる。

植物の休眠の一例として、多年生花卉が越冬の為に越冬芽の休眠があるが、休眠した越冬芽には高い耐冷性と耐凍性が付与され、積雪条件下でも生存できることが明らかとなっている<sup>2)</sup>。このように、越冬芽の休眠は多年生花卉の優れた生存戦略であるが、一方で周年開花の最大の障害となっている。その解決には越冬芽の休眠機構を解明し、人為的に調節する手法を確立する必要があるが、花

卉の越冬芽の学術的研究は殆ど行われておらず、休眠制御に成功した例は全く無い。

参考文献：1) van Breukelen et al., 2010, *Apoptosis*, 15:386. 2) Takahashi et al., 2006, *Breed. Sci.*, 56:39. 3) Urano et al., 2009, *Plant J.*, 57:1065.

## 2. 研究の目的

多年生花卉の周年開花には越冬芽の休眠調節が必須であるが、これまでに成功例は無い。申請者は、リンドウをモデルに越冬芽の休眠に関与する代謝物を調査し、エネルギー物質と共にゲンチオオリゴ糖が休眠調節に直接関与することを示す結果を得た。本研究では、リンドウ越冬芽の休眠調節を目標に、新規休眠調節因子と予想されるゲンチオオリゴ糖の機能解明を目指す。本オリゴ糖の休眠過程における挙動と、越冬芽のエネルギー代謝に及ぼす影響を明らかにすることで、休眠調節の実態を明らかにする。さらに、本オリゴ糖組成を調節する機構を分子レベルで解明することで、休眠調節技術の基礎研究とする。

本研究で得られた成果は、リンドウの周年栽培への応用が期待できる。ビニールハウス等の加温施設を用いてもリンドウは冬期休眠する為、本技術は不可能と考えられているが、本研究で越冬芽の休眠機構が明らかになれば、冬期の休眠抑制により周年開花が見込まれる(図1B)。さらに、リンドウは開花期調節法も確立されていない。申請者の研究から、リンドウの開花は栄養生長に依存すると予想され、越冬芽の萌芽を早めると開花期が早くなることがわかっている。すなわち、越冬芽の休眠期間を調節することで開花期調節が期待できる(図1C, D)。本手法は独創的であり、多年生花卉の新たな栽培技術として産業発展に貢献できる。



図1 休眠調節による開花調節モデル

## 3. 研究の方法

### ①ゲンチオオリゴ糖合成・分解酵素の精製

これまで、ゲンチオビオース(G2)とゲンチアノース(G3)を合成・分解する酵素の情報は殆ど無い。そこで、酵素活性を標的とし、リンドウ粗抽出液からイオン交換カラム等を用いて酵素蛋白質を精製する。ペプチドシークエンス及びMS/MS解析等により、精製蛋白

質のアミノ酸配列を決定し、その配列情報に基づいて遺伝子情報を獲得する。

### ②休眠過程におけるゲンチオオリゴ糖調節機構の解明

休眠誘導期(9~11月)、休眠期(12~2月)、及び萌芽期(3~4月)の越冬芽で、関連が予想される代謝物と酵素遺伝子の経時的解析から、休眠過程のゲンチオオリゴ糖組成と、それを調節する機構を明らかにする。

### ③ゲンチオオリゴ糖による休眠制御メカニズムの解明

ゲンチオオリゴ糖による休眠調節には、本オリゴ糖自体が直接休眠に影響する、または本オリゴ糖由来の代謝物が働くことで休眠に影響する可能性が考えられる。そこで、本オリゴ糖がどのように代謝調節することで休眠を制御するかをメタボロームにより明らかにする。

## 4. 研究成果

休眠期における代謝変動を明らかにするため、10月(休眠誘導期)、1月(休眠期)、3月(萌芽前期)の越冬芽を用いてターゲットメタボローム解析を行なった。アミノ酸、有機酸、ヌクレオチド、糖、ポリアミン等を含む58種の代謝物の定量を行ない、多変量解析によって、それぞれの休眠期に特徴的な代謝変動の検出を試みた。主成分分析の結果、10月、1月、3月の越冬芽は、2つの主成分によって明らかに区別することができた(図2)。全分散のうち、これら主成分で説明される割合は59%であった。1月の越冬芽と、10月及び3月の越冬芽は第1主成分で明らかな差が見られた。第一主成分に寄与するローディングを調べたところ、スクロースとゲンチアノースで高い値が示された。

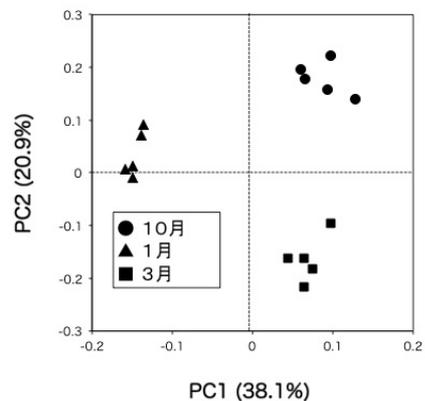


図2 主成分分析

さらに階層クラスター分析を行なった。代謝物は主に 3 つのクラスターに分けられた (図 3)。クラスター 1 は、10 月から 1 月にかけて減少し、3 月に顕著に増加するグループで、アミノ酸、ATP 等のエネルギー代謝物、3-phosphoglycerate 等の解糖系に属する代謝物、グルコースやゲンチオビオース等の還元糖が含まれた。クラスター 2 には明らかな変動が見られず、本クラスターに含まれる代謝物にも特徴は見出せなかった。クラスター 3 に含まれる代謝物は、10 月から 1 月にかけて増加し、3 月まで一定もしくは減少する傾向が観察された。本クラスターには TCA 回路に属する代謝物や、スペルミジン等のポリアミン、スクロースやゲンチアノース等の非還元糖が含まれていた。これらの結果から、糖代謝から産出されるエネルギー代謝物が休眠制御に関わる可能性が示された。特に、リンドウ属に特殊な糖であるゲンチオオリゴ糖との関与が見出された。

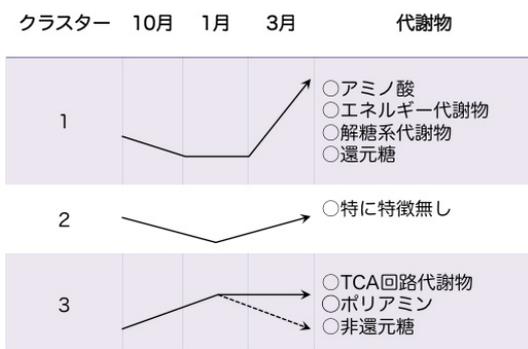


図 3 クラスター解析

これまでの報告で、ゲンチオオリゴ糖の代謝経路を明らかにした例は無い。そこで、本オリゴ糖を代謝する酵素の単離を試みた。G2 分解酵素について、複数のカラムで生成を行ない、部分精製に成功したが、配列の特定には至らなかった。また、13C 標識グルコース (13CG) の添加実験では、リンドウ培養細胞に 13CG を取り込ませると経時的に 13C 標識された G2 が蓄積したが、現在までに経路は完全には特定できていない (図 4)。

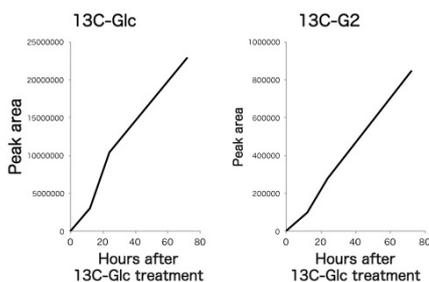


図 4 13CG を用いたトレーサー実験

そこで、過去の報告を基に図 5 に示した予想経路を構築し、関連する代謝物及び酵素遺伝子について解析を行なった。

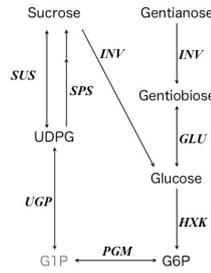


図 5 ゲンチオオリゴ糖予想代謝経路

10 月から 1 月にかけての変化として、スクロースとゲンチアノース量が増加し、それらに関わる Sucrose synthase (SUS) や Sucrose phosphate synthase (SPS) の発現が上昇した (図 6)。一方で、ゲンチオビオース、グルコース、グルコース 6 リン酸 (G6P)、UDP グルコース (UDPG) が減少し、Invertase (INV) や Hexokinase (HXK) の発現が減少した (図 6)。1 月から 3 月では、変動パターンがほぼ逆転し、スクロースとゲンチアノースが減少し、それ以外の糖及び糖リン酸が増加した (図 5)。その際、INV や HXK と共に、Phosphoglucomutase (PGM) と UDPG pyrophosphorylase (UGP) の発現上昇が観察された (図 6)。これら結果から、休眠期には非還元糖が蓄積し、萌芽前期には非還元糖が分解され、エネルギー産出が起きていることが予想された。最も大きい変動が見られた INV と Glucosidase (GLU) に関して、活性測定を行なったところ、INV 活性は 1 月に減少した後、3 月に顕著に増加した。本結果は、遺伝子発現の結果と一致していた。一方 GLU は 10 月から 3 月にかけて減少傾向にあった (図 6)。これら結果から、ゲンチオオリゴ糖の調節に INV が深く関与し、さらに萌芽期には G2 を蓄積させる制御が働く可能性が示された (図 7)。

本オリゴ糖の影響を明らかにするため、培養越冬芽にオリゴ糖をフィーディングし、その後メタボローム解析を行なった。複数の経路に影響が見られたが、システインに関わる経路に活性化が確認された。萌芽期には蛋白質合成が活性化することが予想されるが、萌芽前期に蓄積したアミノ酸を基に、エネルギー産出や成長に関わる蛋白質が合成され、それらを安定させる制御が行なわれている可能性が示された。

本課題の成果から、リンドウ越冬芽の休眠制御機構の一端が明らかとなった。本知見を基に人為的な休眠調節が可能となり、安定栽培への貢献や、休眠調節を利用した開花期調節等への応用が期待できる。

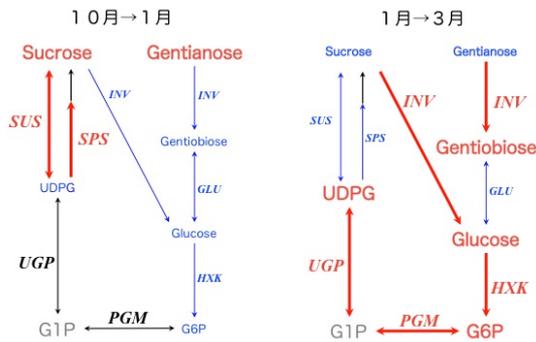


図6 休眠期におけるゲンチオオリゴ糖代謝の変動

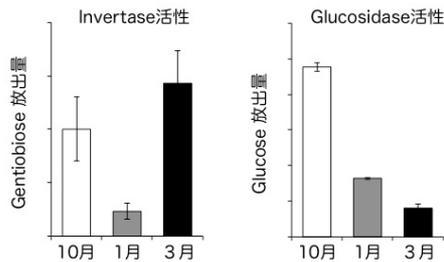


図7 休眠期の関連酵素活性の変動

## 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4件)

- ① 今村智弘、高橋秀行、Molecular characterization and functional analysis of dehydrin in overwintering buds of alpine plant Gentiana、Plant and Microbe Adaptations to Cold (PMAC) 2012、北海道大学
- ② 高橋秀行、今村智弘、金野尚武、竹田匠、Targeted metabolome analysis of overwintering buds of Gentiana triflora during dormancy and breaking of dormancy、10<sup>th</sup> International Congress on Plant Molecular Biology、International Convention Center, Jeju, Korea
- ③ 高橋秀行、今村智弘、金野尚武、樋口敦美、竹田匠、多年生植物の休眠を制御する代謝調節機構の探索、第7回メタボロームシンポジウム、慶応義塾大学
- ④ 高橋秀行、今村智弘、金野尚武、樋口敦美、竹田匠、代謝解析によるリンドウ越冬芽の休眠メカニズムの解明、日本植物生理学会年会、平成25年3月22日、岡山大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 秀行 (TAKAHASHI HIDEYUKI)  
 公益財団法人岩手生物工学研究センター・細胞工学研究部・主任研究員  
 研究者番号：00455247

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし