

平成 31 年 1 月 16 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450033

研究課題名(和文)バラ科果樹におけるソースシンク能の糖シグナルとホルモンによる協同的制御機構の解明

研究課題名(英文) Cooperative regulation of sink and source ability by sugar signals and plant hormones in Rosaceae fruit trees

研究代表者

鈴木 康生 (SUZUKI, YASUO)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30335426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バラ科果樹特有の糖シグナルと植物ホルモンのクロストークによる、遺伝子発現調節機構を解明し、ソース・シンク能の制御機構の理解を目的とした。マイクロアレイ解析により、ソルビトールによって発現が制御されるアラビドプシスの遺伝子群が明らかとなった。ピワS6PDHのcDNAの全長配列が決定された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study to better understand sink-source regulation of Rosaceae fruit trees through investigating gene regulation by cross-talk between specific sugar signal and plant hormones. Microarray analyses revealed genes regulated by sorbitol of Arabidopsis. Full-length cDNA encoding S6PDH was isolated from loquat.

研究分野：園芸生理学

キーワード：バラ科果樹 ソルビトール シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

バラ科果樹は、ソルビトールとスクロースを転流糖として利用しており、これらの糖シグナルを介した遺伝子発現制御を通じて、栄養成長や果実品質が決定される。

すなわち、その作用機作として糖シグナルを通じた遺伝子発現制御であることが示されており (Teo et al., 2006)、ソルビトールとスクロースは多面的な遺伝子発現制御にかかわり、バラ科果樹特有のシグナルネットワークを構築していることを示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、バラ科果樹におけるソース・シンクのキー酵素であるソルビトール 6 リン酸脱水素酵素 (S6PDH) やソルビトール脱水素酵素 (SDH) を対象として、このバラ科果樹特有の糖シグナルと植物ホルモンのクロストークによる、協同的遺伝子発現調節機構を解明し、ソース・シンク能の制御機構の理解を新たなステージへと導くこと目的としている。

3. 研究の方法

播種後およそ 3 週間目のアラビドプシスの本葉 葉柄器官の葉柄部分を糖 (ソルビトール、マニトール、スクロース、グルコース、フルクトース、ポリエチレングリコール 8000 など) 水溶液に入れ、暗所下、23 で 24 時間インキュベートすることにより処理した。本葉より、RNA を抽出し、リアルタイム PCR により遺伝子発現解析を行った。内部標準にはアクチンを用いた。さらに、ソルビトール及びシュクロース処理をした本葉より RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子の発現を網羅的に調べた。マイクロアレイは、アジレント社の Arabidopsis オリゴ DNA マイクロアレイ Ver.4.0 を用いて、1 色法で行われた。

4. 研究成果

糖シグナルとしてのソルビトールによる転写制御機構の解明するために、ソルビトールに発現を制御される遺伝子のシスエレメントの決定をアラビドプシスで試みた。アラビドプシスには、SDH ホモログが単一遺伝子として存在することが明らかとなっている。アラビドプシスの本葉を用いて、ソルビトール処理により SDH 遺伝子の発現が誘導される実験系を確立した。当初、本葉の葉片のソルビトール水溶液への浸漬処理や、バキュームインフィルトレーション法による処理を試みたが、いずれも SDH 遺伝子の発現に顕著な変動みとめられなかった。そこで、成葉-葉柄器官の葉柄部分を水溶液に浸漬し、蒸散流を利用して処理を行う方法を試みた。その

結果、本実験系において、SDH 遺伝子はソルビトール及びマニトールで発現が特異的に誘導され、スクロースやヘキソースなどの糖で発現が抑制された。

また、発現誘導の処理時間及び濃度の影響が明らかとなった。さらに、SDH 遺伝子のプロモーター解析を行うために、データベース上で公開されているアラビドプシスのゲノム情報をもとにプライマーを設計し、SDH 遺伝子のゲノムの上流およそ 5 kb のプロモーター領域と予測される部分を単離、クローニングを行うとともに、遺伝子発現解析を行うためのトランジェントアッセイ系を導入するために、アラビドプシスの培養細胞を用いた解析も行った。

バラ科果樹における、糖シグナル経路の解明を目的して、その基盤的知見を得るために、アラビドプシスを用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。アラビドプシスにおいて糖応答反応モデルが提唱されているが、糖アルコールとしてのソルビトールの反応については未解明である。アラビドプシスにおいて、ソルビトール処理がソルビトール脱水素酵素 (SDH) の遺伝子の発現を特異的に誘導する実験系を用いて、ソルビトール及びシュクロース処理をした際の遺伝子の発現を網羅的に調べた。その結果、糖シグナル経路に関連する遺伝子、ソルビトール代謝等に関連する遺伝子、シュクロース代謝等に関する遺伝子、ヘキソース代謝等に関する遺伝子など、ソルビトールによる遺伝子の発現制御に関する結果が得られるなど、基盤的な情報が得られた。

バラ科果樹においては、研究材料からの RNA 抽出が時間と労力を要し、研究の推進を大きく制限するものであった。そこで、多検体のハイスループットな抽出方法を検討した。その結果、高分子化合物を用いる等により、従来法と比べ極めて短時間かつ同時に多検体から調製しうる RNA 抽出法を確立することができた。また、ソース能及びシンク能のキー酵素であるソルビトール 6 リン酸脱水素酵素 (S6PDH) 及びソルビトール脱水素酵素 (SDH) の発現を活性レベル及び遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでの発現をも明らかにするため、それらの抗体を調製した。

本研究ではバラ科果樹のモデルとして、常緑果樹であるビワを選定した。ビワは、リンゴやモモなどの他のバラ科果樹と異なり、現在までゲノムが解読されておらず、ソースのキー酵素である S6PDH の全長クローンも得られていない。また、アイソザイムの報告もこれまでにない。そこで、ビワ S6PDH の cDNA の全長配列を決定することとした。ビワ成熟葉より、RNA を抽出し、RACE 法により S6PDH の cDNA の全長配列を決定した。ビワ成熟葉は採取直後のもの及び糖 (スクロ

ース)処理したものをを用いたが、得られたクローンはいずれも同一であった。ピワ S6PDH は、310 個のアミノ酸からなり、リンゴ、ナナカマド、セイヨウナシの S6PDH とアミノ酸レベルで、いずれも 96%以上の高い相同性がみとめられた。

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 1 件)

Yasuo Suzuki (2015) Polyol metabolism and stress tolerance in horticultural plants. p. 59-73. In: Yoshinori Kanayama and Alexey V. Kochetov (Eds.). Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants. Springer.

〔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

鈴木 康生 (YASUO SUZUKI)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：30335426