

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04454

研究課題名(和文)オリゴ糖をシグナルとする多年生植物の相転換機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of oligosaccharide signaling inducing phase transition in herbaceous perennials

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・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：00455247

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、多年生植物であるリンドウのオリゴ糖を介した相転換機構の解明を目指した。メタボローム及びRNA-seq解析から、相転換期に変動する代謝物及び相転換関連遺伝子が明らかとなり、ゲンチオオリゴ糖が誘導する相転換関連遺伝子が見出されたことから、本オリゴ糖と相転換との関与が示唆された。また、ゲンチオビオース量の調節に関わる新規グルコシダーゼGtGen3Aを得た。Gtgen3Aを含む本研究で選抜された遺伝子の発現調節が相転換に影響する可能性が見出されており、これら形質転換体を詳細に解析することでゲンチオオリゴ糖による相転換機構の解明に繋がることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gentian (*Gentiana triflora*) is an herbaceous perennial that possesses several growth phases, including germination, growth, and dormancy. This study aimed to reveal the relationship between gentio-oligosaccharide metabolism and growth phase transitions. Metabolome and RNA-seq analyses revealed that several metabolites and genes were fluctuated during each phase transition, and some genes related to phase transition were induced by gentio-oligosaccharide application, implying that the oligosaccharides related to phase transition in gentian. Furthermore, we identified gentio-oligosaccharide degradative enzyme, GtGen3A, which is involved in controlling gentiobiose concentration. Because genetic modification of genes found in this study, including Gtgen3A, seemed to affect developmental processes, more detailed analysis will reveal the regulatory mechanisms of phase transition mediated by gentio-oligosaccharides.

研究分野：植物代謝

キーワード：花卉 開花 休眠 成長相転換 リンドウ

## 1. 研究開始当初の背景

糖類は細胞活動のエネルギー源、組織の構成成分であると共に、細胞の浸透圧調整・凍害保護等の生理活性物質として働くことも知られている。さらに近年では、オリゴ糖による果実の成熟促進、花成調節、花芽の成長促進が報告され、オリゴ糖をシグナル分子とした生理・発生調節機構の存在が見出され始めている。これまでに、微生物のオリゴ糖をシグナルとした生体防御応答の分子機構については数多くの知見があるが、植物由来のオリゴ糖がシグナル分子として働く機構は大部分が不明なままである。

研究代表者のグループはモデルとしてゲンチオオリゴ糖を含むリンドウ (*Gentiana triflora*) を使用し、植物における糖を介した相転換機構の解明を目指している。リンドウには複数の成長相が存在し、休眠期(冬芽形成～萌芽)について、先行研究により以下の知見を得た。萌芽期に蓄積するゲンチオオリゴ糖の1つであるゲンチオピオースが萌芽誘導シグナルとして働くことを証明した。また、高濃度のショ糖を処理することで冬芽形成が促されることを明らかにした。これらの知見は、糖がシグナルとなり、休眠期の相転換を制御することを示している。

一方で、近年、花成誘導因子である *FLOWERING LOCUS T (FT)* が、ポプラでは花成のみならず冬芽の休眠調節に作用することが報告された。さらに、FT は冬芽形成や種子発芽の調節にも関わることが報告されている。研究代表者はリンドウ *FT1 (GtFT1)* が花成を誘導することを明らかにすると共に、冬芽では、ゲンチオオリゴ糖量と相関があること見出している。また、前述のゲンチオオリゴ糖による萌芽誘導には、一般的には種子の発芽誘導に作用することで知られる経路が関与していた。以上の知見は、ゲンチオオリゴ糖が休眠のみならず、種子発芽や開花等、複数の成長相転換時にシグナルとして働く可能性を強く示唆している。しかしながら、本オリゴ糖が相転換を調節する分子機構、受容体の存在、他の成長相の転換に伴う代謝や遺伝子発現の動態は未だ不明であり、オリゴ糖による相転換機構の全容解明には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、**1. ゲンチオオリゴ糖が調節する代謝・遺伝子発現変動の解明**、**2. ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子との相互作用の解明**、**3. ゲンチオオリゴ糖結合蛋白質の探索**、**4. ゲンチオオリゴ糖代謝経路の解明**の4サブテーマから、リンドウの各相転換期におけるゲンチオオリゴ糖を介した相転換シグナル伝達の実態を明らかにする。では、ゲンチオオリゴ糖が代謝全体に与える影響を、メタボローム及びトランスクリプト

ーム解析により網羅的に検出し、相転換に至るまでの調節過程を明らかにする。では、相転換遺伝子の発現調節によるゲンチオオリゴ糖への影響、ゲンチオオリゴ糖処理による相転換遺伝子への影響の両面から作用機構を明らかにする。では、ゲンチオオリゴ糖の受容体または結合蛋白質を探索し、本オリゴ糖のシグナル受容機構を蛋白質レベルで検討する。では、ゲンチオオリゴ糖を合成・分解する酵素の探索から、これまで未知であったゲンチオオリゴ糖代謝経路を特定し、本オリゴ糖組成を調節する分子機構を解明する。以上の解明を、種子発芽、開花、休眠等の複数の相転換に対して行ない、得られた情報を統合し、ゲンチオオリゴ糖による相転換機構の全容解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

**1. ゲンチオオリゴ糖が調節する代謝・遺伝子発現変動の解明**

### I- ゲンチオオリゴ糖処理サンプルのメタボローム解析

研究代表者が確立した糖取込み法を用いて、ゲンチオオリゴ糖を越冬芽に取込ませた後、メタボローム解析により網羅的に代謝変動を検出する。本解析は処理後から経時的に行ない、ゲンチオオリゴ糖が特異的に影響する代謝経路を同定する。メタボローム解析には、キャピラリー電気泳動質量分析装置 (CE-TOFMS) と高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-TOFMS) を用いる。

### I- 1年を通じた各組織におけるゲンチオオリゴ糖の挙動解析

リンドウの各組織(種子、葉、茎頂、塊茎、根)に含まれるゲンチオオリゴ糖を、LC-TOFMS で経時的に定量し、挙動を明らかにする。検出された新規オリゴ糖は、ゲル濾過カラムで精製後、メチル化解析で結合様式を明らかにする。

### I- ゲンチオオリゴ糖処理サンプルのRNA-seq解析

ゲンチオオリゴ糖処理を施した培養植物体及び種子で、次世代シーケンサーによるRNA-seq解析を行なう。RNAseq解析は中塚ら (*Plant Cell Rep.*, 32:1925, 2013) の手法で行ない、RNAライブラリー調整キットにはTruSeq RNA sample preparation kits v2を用いる。得られた情報をメタボローム解析の結果と統合し、特異的に影響を受ける代謝経路を検出する。

### II. ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の相互作用の解明

#### II- 相転換遺伝子の挙動解析

種子休眠～発芽期、栄養成長～生殖成長期、冬芽形成～萌芽期のリンドウで、相転換遺伝

子について、リアルタイム PCR を用いて発現挙動を解析する。

#### II- ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の相互作用の探索

相転換遺伝子をリンゴ小球型潜在ウイルス (ALSV) ベクターを用いて越冬芽で高発現または発現抑制し、メタボローム解析を通じて相転換遺伝子からオリゴ糖への影響を明らかにする。逆に、ゲンチオオリゴ糖を取込ませた越冬芽で、相転換遺伝子の発現への影響をリアルタイム PCR で検出する。これら解析から、相転換遺伝子とゲンチオオリゴ糖の相互作用を証明する。

#### III. ゲンチオオリゴ糖結合蛋白質の探索

##### III- ゲンチオオリゴ糖受容体の探索

オリゴ糖がシグナルとして働く場合、受容体の存在が予想される。そこで、ゲンチオオリゴ糖に結合する蛋白質を探索する。ゲンチオオリゴ糖を固定した樹脂とリンドウ粗抽出液を混合し、結合した蛋白質をオービトラップ質量分析装置でプロテオーム解析する。アミノ酸配列を EST に照合し遺伝子配列を得た後、その挙動を遺伝子レベルで明らかにする。

##### III- ゲンチオオリゴ糖修飾蛋白質の探索

蛋白質への糖鎖付加は様々な生理作用を調節すると考えられており、リンドウにおいてもゲンチオオリゴ糖が蛋白質に結合することでシグナルとして働く可能性がある。そこで、ピオチン標識ゲンチオオリゴ糖を用いて、結合蛋白質を検出する。

#### IV. ゲンチオオリゴ糖代謝経路の解明

##### IV- ゲンチオオリゴ糖関連酵素の探索及び融合蛋白質の作成

オリゴ糖分解活性を指標とし、リンドウ越冬芽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。精製蛋白質は、MS/MS 解析により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。得られた酵素について、大腸菌を用いて融合蛋白質を作成し、基質特異性や pH 依存性等の酵素特性を評価する。

##### IV- ゲンチオオリゴ糖関連酵素のリンドウ形質転換体の作成と評価

IV- で得られた酵素について、高発現体及び発現抑制体を作成する。得られた形質転換体について、成長相転換への影響と共に、ゲンチオオリゴ糖組成と相転換遺伝子発現への影響を調査する。

## 4. 研究成果

### I. ゲンチオオリゴ糖が調節する代謝・遺伝子

### 発現変動の解明

#### I- ゲンチオオリゴ糖処理した越冬芽で誘導される代謝・遺伝子変動

培養した越冬芽にゲンチオオリゴ糖を取り込ませ、代謝及び遺伝子発現への影響をメタボローム解析と RNA-seq 解析で調査した。代謝物レベルでは含硫代謝物の増加が確認され、その下流にある酸化還元代謝物であるグルタチオンとアスコルビン酸も増加していた。さらに、酸化還元レベルが顕著に変動することが明らかとなった。遺伝子発現レベルでは、糖代謝に関与する遺伝子の他に、植物ホルモン、増殖・伸長、相転換、細胞周期に関与する遺伝子群の発現が上昇したことから、オリゴ糖が相転換または細胞周期の進行に影響し、細胞増殖や伸長を促すことで萌芽が誘導される可能性が見出された。

#### I- 1年を通じたゲンチオオリゴ糖の挙動解析

リンドウの各組織における単糖及びオリゴ糖の挙動を調査した。葉ではゲンチオビオースとグルコースが多量に蓄積しており、休眠期から栄養成長期に向けて蓄積量が増大した(図1)。また、ゲンチアノースは休眠期に蓄積することが明らかとなった。地下部ではシュクロースとゲンチアノースが多量に蓄積していたが、一年を通じて顕著な変動は観察されなかった。

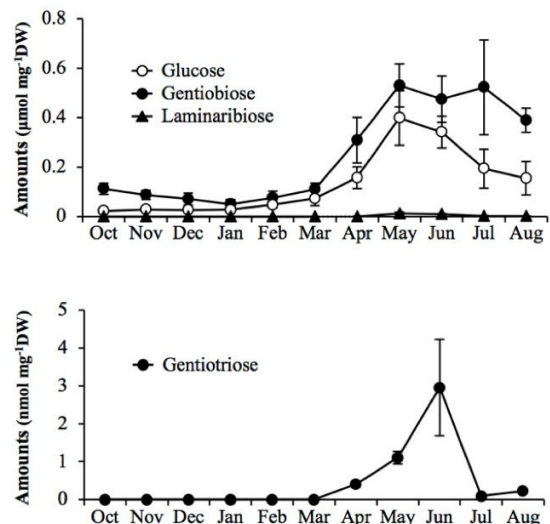


図1 リンドウ葉に含まれる糖類の挙動

さらに、4品種の種子で播種から発芽に至るまでの代謝物組成を調査した。播種後0~7日目の糖組成を調査し、グルコース、ゲンチオビオース、マルトースが発芽に向け顕著に蓄積量が増大した(図2)。

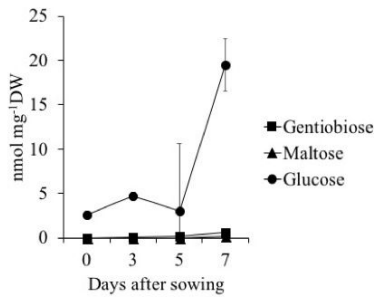


図2 リンドウ種子における糖類の挙動

糖類の網羅的解析から、生殖成長期のリンドウ葉には分子量 504 のオリゴ糖が蓄積することが明らかとなった。そこで本糖を精製し NMR で構造を解析した (図 3)。その結果、本糖はグルコースが 3 つ -1,6 結合したゲンチオトリオースであることが判明した。ゲンチオトリオースは 3 月から 7 月にかけて増加し、その後は減少することが示された (図 1)。

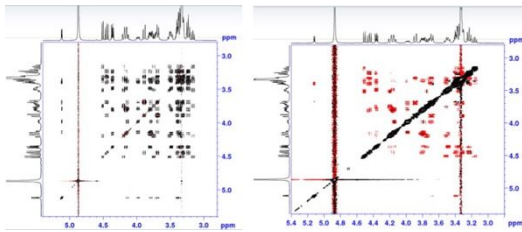


図3 リンドウ葉から精製したオリゴ糖の NMR 解析

## II. ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の相互作用の解明

### II- 相転換遺伝子の挙動解析

休眠期～萌芽期～栄養成長期～生殖成長期のリンドウで相転換に關与する遺伝子の発現挙動を調査した (図 4)。その結果、休眠導入期、休眠変遷期、萌芽期、生殖成長期に発現上昇する遺伝子が得られた。その中には休眠期にのみ発現するもの、生殖成長期にのみ発現するもの、それら両方で発現するものがあり、機能が分化している可能性が見出された。

### II- ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の相互作用の探索

ゲンチオピオース処理した培養越冬芽を用いて II- で挙動が観察された遺伝子の挙動を調査した (図 5)。一部の遺伝子で応答が観察されたが、特に圃場サンプルで萌芽期に発現が上昇した遺伝子の発現がゲンチオピオースにより誘導されることが示された。しかし一方で、本遺伝子の発現を調節することが報告されている遺伝子の発現には影響が見られなかったことから、一般的なモデル

植物には存在しないリンドウに特有の調節メカニズムが存在する可能性が見出された。

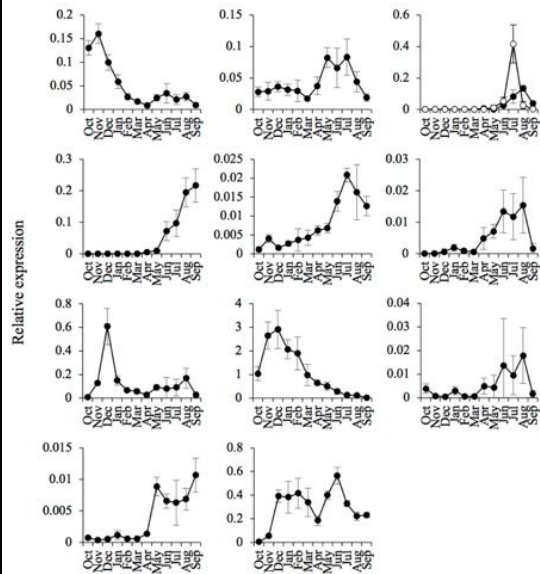


図4 リンドウの相転換関連遺伝子の発現

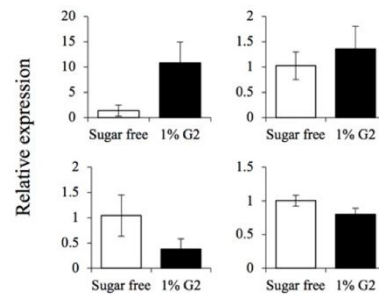


図5 ゲンチオオリゴ糖による相転換遺伝子への影響

II- で挙動が観察された遺伝子については、高発現体及びゲノム編集体を作成した。例として、相転換遺伝子のゲノム編集個体を図 6 に示した。これらの形質転換体については成長及び相転換への影響を調査し、さらにメタボローム解析から影響を受ける代謝経路を探索した。

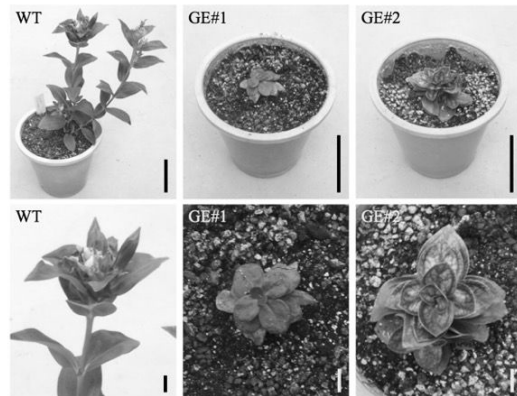


図6 ゲノム編集個体の成長

### III. ゲンチオオリゴ糖結合蛋白質の探索

エポキシ樹脂にゲンチオピオースを固定して作成したオープンカラムを用いて、ゲンチオピオースに結合する蛋白質の精製を試みた。リンドウ越冬芽の膜蛋白質画分を精製し、コントロールカラム (Ctrl) またはゲンチオピオース固定カラム (G2) に吸着させ、100 mM ゲンチオピオースで溶出し、SDS 電気泳動した (図7)。その結果、矢頭で示した蛋白質がゲンチオピオースと結合することが示唆された。これらの蛋白質はオービトラップ質量分析装置で同定した。

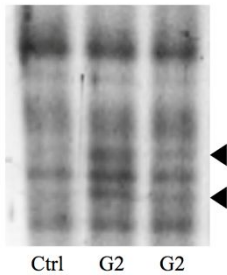


図7 ゲンチオピオース結合蛋白質

### IV. ゲンチオオリゴ糖代謝経路の解明

IV- ゲンチオオリゴ糖関連酵素の探索及び融合蛋白質の作成

ゲンチオピオースを分解する活性を指標に、複数のカラムを用いてリンドウ越冬芽から蛋白質を精製した (図8)。オービトラップ質量分析装置で解析した結果、67 kDa の蛋白質がグルコシダーゼとアノテーションがついたことから、本蛋白質を GtGen3A と命名し、諸性質を調査した。

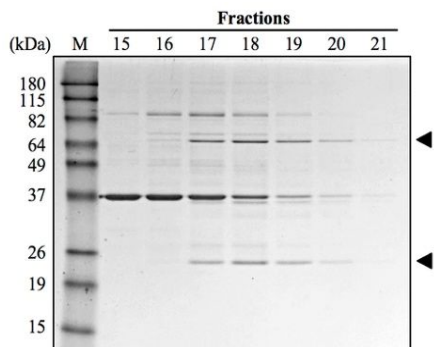


図8 リンドウ葉からの GtGen3A の精製

カラムを用いた精製では完全精製に至らなかったため、大腸菌を用いて融合蛋白質 rGtGen3A を作出した。至適温度と pH を調査したところ、rGtGen3A は 20 °C、pH 6.5 の条件で最大活性を示すことが判明した (図9A)。また、rGtGen3A はゲンチオトリオース (G3) に対して最も高い基質特異性を示した (図9B)。

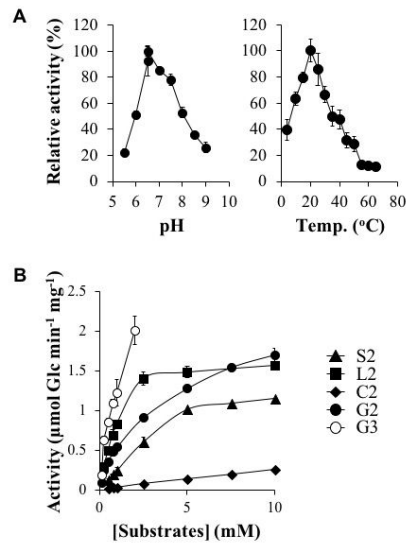


図9 rGtGen3A の酵素学的諸性質

*Gtgen3A* の遺伝子発現を調査した結果、休眠期には発現量が低く、萌芽期以降に発現が上昇することが明らかとなった (図10)。また、この挙動はゲンチオピオースの蓄積と類似していること、rGen3A がゲンチオトリオースに対して最大活性を示すことから、Gen3A はゲンチオピオース量を調節する酵素であることが示された。

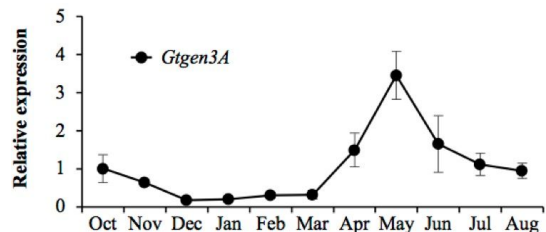


図10 リンドウにおける *Gtgen3A* の発現

本課題の成果から、リンドウにおけるゲンチオオリゴ糖代謝の制御メカニズムの一端が明らかとなった。ゲンチオオリゴ糖代謝は動物及び菌類でも殆ど明らかとなっておらず、植物では初の知見である。相転換に関しては、関与が予想される候補遺伝子の単離に成功し、ゲンチオオリゴ糖により発現誘導される遺伝子についても解析を進めている。これら遺伝子については高発現体及びゲノム編集体を作成済みであり、さらに詳細に解析することでゲンチオオリゴ糖による相転換メカニズムが明らかになると期待できる。

### 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6件)

Takahashi H and Nishihara M. (2015). Gentiobiose feeding in gentian *in vitro* overwintering buds or plantlets. *Bio-protocol*. 5 (12), e1499.

Imamura T, Fujita K, Tasaki K, Higuchi A, and Takahashi H. (2015). Characterization of spermidine synthase and spermine synthase – the polyamine-synthetic enzymes that induce early flowering in *Gentiana triflora*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463, 781-786.

Takahashi H, Fujita K, Yoshida C, and Nishihara M. (2016). Metabolite profiling reveals the involvement of aberrant metabolic changes in *Gentiana triflora* seed showing poor germination. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 91 (2), 148-155.

Takahashi H, Abe H, Fujita K, and Sekine K-T. (2017). The use of metabolome analysis to identify the cause of an unexplained disease of Japanese gentians (*Gentiana triflora*). *Metabolomics*. 13 (51), 1-11.

Nishihara M, Tasaki K, Sasaki N, and Takahashi H. (2018). Development of basic technologies for improvement of breeding and cultivation in Japanese gentian. *Breed. Sci.* 68, 14-24.

Takahashi H, Kikuchi-Fujisaki S, Yoshida C, Yamada H, Yamashita T, Konno N, and Takeda T. (2018). Gtgen3A, a novel plant GH3  $\beta$ -glucosidase, modulates gentio- oligosaccharide metabolism in *Gentiana*. *Biochem. J.* 475, 1309-1322.

〔学会発表〕(計6件)

高橋秀行<sup>1</sup>、今村智弘<sup>2</sup>、金野尚武<sup>3</sup>、藤田晃平<sup>1</sup>、竹田匠<sup>1</sup>、西原昌宏<sup>1</sup>(1.岩手生工研、2.東京理科大、3.宇都宮大)「ゲンチオオリゴ糖をシグナルとするリンドウ越冬芽の休眠調節機構の解明」第56回日本植物生理学会年会(2015年3月)

高橋秀行<sup>1</sup>、藤田晃平<sup>1</sup>、今村智弘<sup>2</sup>、西原昌宏<sup>1</sup>(1.岩手生工研、2.東京理科大)「ゲンチオオリゴ糖によるリンドウ越冬芽の萌芽誘導機構」第33回日本植物細胞分子生物学会(東京)大会・シンポジウム(2015年8月)

Takahashi H.「Gentio-oligosaccharide regulates bud dormancy in *Gentiana triflora*」KAAB International Symposium 2015(2015年9月)

高橋秀行<sup>1</sup>、藤田晃平<sup>1</sup>、竹田匠<sup>1</sup>、金野尚武<sup>2</sup>(1.岩手生工研、2.宇都宮大)「リンドウにおけるゲンチオオリゴ糖代謝調節酵素 GtGen3A の解析」第57回日本植物生理学会年会(2016年3月)

高橋秀行、阿部弘、藤田晃平、関根健太郎「Metabolome analysis revealed the cause of an unexplained disease of Japanese gentian」第58回日本植物生理学会年会(2017年3月)

高橋秀行<sup>1</sup>、加藤大明<sup>1</sup>、竹田匠<sup>1</sup>、金野尚武<sup>2</sup>(1.岩手生工研、2.宇都宮大)「ゲンチオ

オリゴ糖代謝を調節する酵素 GtGen3A の機能解析」第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会・シンポジウム(2017年8月)

(招待講演)高橋秀行「リンドウの安定生産に向けたメタボロミクス技術の利用」第7回新潟大学・刈羽村先端農業バイオ研究センターフォーラム「農業バイオとオミクス～先端技術による農業バイオの新展開」(2016)新潟大学農学部

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

受賞  
高橋秀行「日本植物細胞分子生物学会奨励賞」(2015年8月11日)

報道

高橋秀行「岩手日報」2015年9月23日

高橋秀行「岩手日報」2015年9月24日

高橋秀行「岩手日日新聞」2015年10月6日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋秀行(HIDEYUKI TAKAHASHI)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号: 00455247

### (2) 研究分担者

西原昌宏(NISHIHARA MASAHIRO)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究部長

研究者番号: 20390883

今野尚武(KONNO NAOTAKE)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号: 60549880

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

藤田晃平(FUJITA KOUHEI)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手

吉田千春(YOSHIDA CHIHARU)

公益財団法人 岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・研究助手