

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03760

研究課題名(和文) タマネギ鱗茎におけるフルクトオリゴ糖の代謝メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of molecular mechanisms involved in fructan metabolism in onion bulbs

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：収穫した鱗茎のフルクタン含量が異なるタマネギ2品種を用いて、フルクタン含量の違いに関わる分子メカニズムについて解明することを目的とした。定植から収穫期まで、鱗茎や葉身のフルクタン含量やフルクタン代謝に関わる酵素活性を調べたところ、2品種のフルクタン合成酵素活性に違いはなく、フルクタン量の違いには鱗茎肥大開始前のフルクタン分解酵素の違いやスクロース蓄積量に関わると考えられた。これまで、タマネギでフルクタン分解に関わる遺伝子は見つかっていなかったが、本研究において、6G&1-FEH活性を示すフルクタン加水分解遺伝子を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までに植物で同定されたフルクタン合成酵素は、液胞型インベルターゼとのアミノ酸相同性を示すことから液胞に局在すると考えられてきた。一方、フルクタン加水分解酵素はすべて細胞壁型インベルターゼに相同性を示し、フルクタン代謝酵素の細胞内局在については議論が続いていた。本研究では、液胞型インベルターゼとの相同性を示すフルクタン加水分解酵素を植物で初めて同定した。また、これまでフルクタン代謝酵素の細胞内局在を示す研究例はなかったが、本研究では、フルクタン合成および分解に関わる酵素がどちらも液胞に局在することを実験的に証明することができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate molecular mechanisms involved in the differences of fructan accumulation in the harvested bulbs in two onion cultivars. From planting to harvest, the fructan contents of bulbs and leaf blades and the enzyme activities related to fructan metabolism were examined. We found that the difference in enzymatic activities of fructan hydrolase (FEH), not fructosyltransferases, and sucrose accumulation before bulb enlargement would be related to the levels of fructan accumulation in the bulb. There have been no reports of the FEH gene in onion, but in this study, we successfully identified a FEH showing 6G & 1-FEH activity. All fructan hydrolases known in plants showed amino acid similarity to cell-wall invertases, but we identified a FEH that is homologous to vacuolar invertases for the first time. In this study, we experimentally demonstrated that the enzymes involved in fructan synthesis and degradation are actually localized in the vacuole.

研究分野：園芸学、植物生理学

キーワード：タマネギ フルクトオリゴ糖 フルクタン分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タマネギは健康野菜として知られ、ケルセチンや硫化アリルのような機能性成分の他に、プレバイオティクス作用を示す水溶性食物繊維「フルクタン」を豊富に含んでいる。フルクタンはスクロースにフルクトースが重合結合したフルクトオリゴ糖であり、植物の種類によって重合度や分枝の有無が多様であり、その機能性も異なっている。フルクタンには食品としての利用価値がある一方、植物体内では、貯蔵養分として休眠中や萌芽時のエネルギー源として利用されており、また、耐病性や耐凍性の付与にも関わるとされる。タマネギのフルクタン代謝に関する研究は、タマネギの食味、機能性、環境ストレス耐性の向上など、有用なタマネギ新品種を育成する際に役立つ知見となり得る。我々はこれまでに、国内で栽培されている様々なタマネギ品種には、フルクタンの量や組成に大きな違いがあることを見出したが、この品種間差が生じる要因は不明であった。タマネギは分子生物学的な研究がまだ少なく、フルクタンの合成や分解、フルクタン蓄積と関わる生理作用など、関連する分子メカニズムの多くは明らかになっていない。

2. 研究の目的

フルクタンの量や組成はタマネギの品質に関わる重要なファクターであるが、タマネギのフルクタン合成や分解に関する分子レベルの知見は少なく、鱗茎のフルクタン蓄積を制御する分子メカニズムは明らかになっていない。本研究では、フルクタン含量が異なるタマネギ品種を材料に用いて、鱗茎発達過程におけるタマネギ植物体内の単糖類やフルクタンの蓄積動態、フルクタン代謝に関わる酵素遺伝子の同定やその機能解析を行い、フルクタン蓄積の品種間差に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タマネギ生育期間のフルクタン蓄積および代謝酵素活性の解析

収穫した鱗茎において、異なるフルクタン量を示したタマネギ2品種‘北もみじ2000’(フルクタン含量が高く、高重合度のフルクタンを蓄積)と‘ポールスター’(‘北もみじ2000’と同様同じ熟期であるが、フルクタンをほとんど蓄積せず、単糖を優先的に蓄積する)を栽培し、定植から収穫期まで葉身および葉鞘基部(生育後期では鱗茎)を採取して、単糖およびフルクタン蓄積の変動を調べた。また、同じ組織から粗タンパク質を抽出し、フルクタン合成酵素および分解酵素活性の変動も評価した。

(2) フルクタン合成および分解酵素の同定および酵素の機能解析

フルクトースの転移や加水分解反応を触媒するフルクタン合成および分解酵素は、フルクトシダーゼ活性を持つインベルターゼファミリーに含まれる。インベルターゼファミリー遺伝子の保存領域を増幅する縮重プライマーを作製し、フルクタン代謝に関わる遺伝子の同定を試みた。得られた候補遺伝子は、*Pichia pastoris*発現系で組み換え酵素を作製し、その活性を評価した。また、タバコプロトプラストやBY-2培養細胞を用いてタンパク質を発現させ、植物細胞内におけるフルクタン代謝酵素の活性も評価した。また、蛍光タンパク質を融合させた酵素を細胞内で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡や蛍光顕微鏡で観察することで、フルクタン代謝酵素の細胞内局在を調べた。フルクタン分解酵素については、分解活性の高い時期のタマネギ鱗茎を材料に native 酵素の精製を行い、そのアミノ酸配列の予測、酵素の基質特異性について解析した。

4. 研究成果

(1) タマネギ生育期間におけるフルクタン蓄積の推移

4月下旬の定植から8月中旬の収穫まで、2品種のタマネギを2週間おきにサンプリングし、葉身および葉鞘基部の糖含量の推移を調べた。鱗茎の肥大は7月中旬にみられた。収穫時の鱗茎のフルクタン含量が低い‘ポールスター’でも、鱗茎肥大前は‘北もみじ2000’と同程度のフルクタンを鱗茎に蓄積しており、重合度にも違いがほとんどなかった。鱗茎肥大の開始後、鱗茎のフルクタン含量に違いがはじめ、それが収穫期まで維持されて品種間差を生じていることが分かった(図1)。地下部の鱗茎組織に加えて、地上部の葉身組織のフルクタン含量も調べたところ、葉身でも生育初期にフルクタンが高く蓄積していることが分かった(図1)。7月になって鱗茎肥大が開始した後は葉身でのフルクタン蓄積は検出されなくなった。生育期間を通じて、葉身のフルクタン含量に品種間差はなかった。しかし、鱗茎肥大時期の葉身のスクロース含量は‘ポールスター’よりも‘北もみじ2000’で高かった(図1)。「北もみじ2000」はより多くのスクロースを地下部の鱗茎へ転流させることができると思われ、このことが鱗茎肥大中のフルクタン含量の品種間差に関わるのではないかと考えられた。

(2) タマネギ生育期間におけるフルクタン代謝酵素活性

粗タンパク質を葉鞘基部や鱗茎から抽出し、基質であるスクロースやフルクタンと反応させ、得られた生成物を HPLC-PAD で分析してタマネギ生育中のフルクタン代謝酵素活性の変動を評価

した。その結果、鱗茎が肥大する間、フルクタン合成に関わる 1-SST、6G-FFT および 1-FFT 活性のすべては‘北もみじ 2000’より‘ポールスター’で高かった(図 2)。このことから、鱗茎に蓄積するフルクタン量は、鱗茎の肥大時のフルクタン合成酵素活性の強弱と関わらないことが示唆された。また、合成酵素の活性よりも、酵素反応に影響する基質量が‘ポールスター’と‘北もみじ 2000’で異なるのではないかと考えられた。一方、‘ポールスター’のフルクタン分解酵素活性は、生育期間のほぼ全体で‘北もみじ 2000’よりも高く、特に鱗茎肥大前の 6 月はインベルターゼと 1-FEH 活性が‘ポールスター’で著しく高かった(図 2)。これらのことから、フルクタン含量の品種間差には、フルクタン合成酵素活性よりもフルクタン分解酵素活性の影響が大きく、また、鱗茎肥大開始前のフルクタン合成の基質量も影響を及ぼす可能性が考えられた。

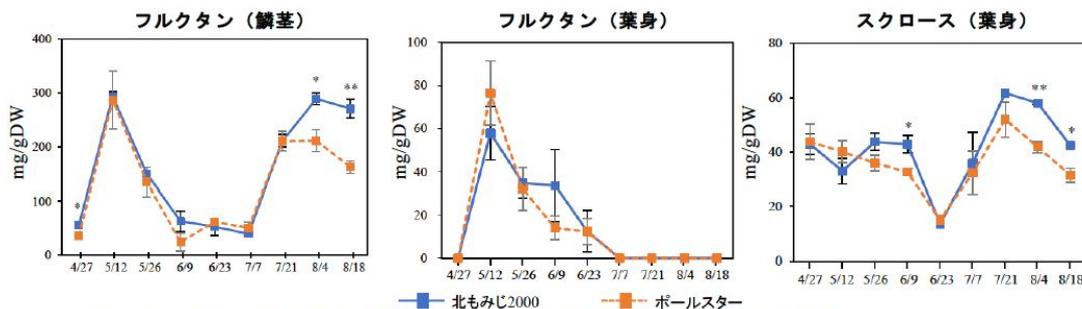


図1. タマネギ2品種の生育期間中のフルクタンとスクロースの蓄積の推移
鱗茎肥大は7/7~7/21に確認。*, **はそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり (t検定)

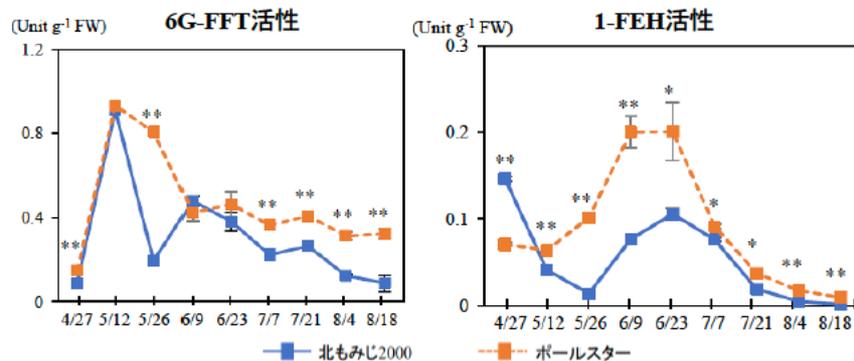


図2. 鱗茎由来の粗タンパク質を用いたフルクタン代謝酵素活性の推移
*, **はそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり (t検定)

(3) フルクタン分解酵素の同定および酵素の機能解析

インベルターゼファミリー遺伝子の保存領域を増幅する縮重プライマーを作成し、フルクタン代謝に関わる遺伝子の同定を試みたところ、液胞型インベルターゼグループから 1-SST、6G-FFT、インベルターゼ、さらにこれらとは異なる別の配列が得られた。細胞壁インベルターゼグループからは 3 種類の候補配列が得られた。全長配列を決定できたものは、*Pichia pastoris* で組換えタンパク質の発現させ、スクロースやフルクタンへの触媒活性を評価した。その結果、解析したクローンの中に、1-ケストースや 6-ケストースの分解活性を示すものがあり、それらはフルクタン加水分解酵素 (FEH) 遺伝子であることが示唆された。また、タバコ細胞を用いたタンパク質発現系でも酵素活性を評価したところ、1-ケストース分解活性を確認することができ、タマネギで初である FEH 遺伝子を得ることができた。この FEH の基質特異性をさらに調べたところ、1-ケストースだけでなく、ネオケストースや 1&6G-kestotetraose も分解する活性を示した。分解様式をみると、フルクトース-フルクトース間の (2 1) 結合だけでなく、フルクトース-グルコース間の (2 6) 結合も分解していたことから、タマネギで見つかった FEH はこれまで唯一アスパラガスでのみ報告がある 6G&1-FEH 活性を持つ FEH であることが示された。1-FEH 活性が高いことが分かっている鱗茎肥大前の‘ポールスター’の鱗茎を用いて、native FEH を部分的に精製することができた。アミノ酸配列解析の結果、上述の 6G&1-FEH と同じアミノ酸配列を持つことが分かり、この時期の高い 1-FEH 活性はこの 6G&1-FEH 遺伝子産物によることが示唆された。

(4) フルクトタン分解酵素の局在解析

これまで他の植物で見つかったフルクトタン加水分解酵素 FEH は、すべて、細胞壁型インベルターゼとアミノ酸相同性を持つ。一方、1-SST などのフルクトース転移酵素は液胞型インベルターゼとアミノ酸相同性を持つもののみが見つかった。今回、タマネギで見つかったフルクトタン加水分解酵素 (タマネギ 6G&1-FEH) は液胞型インベルターゼとの相同性を示した。また、タマネギ 6G&1-FEH と既知のフルクトタン代謝酵素との系統解析でも、タマネギ 6G&1-FEH は液胞型インベルターゼや 1-SST や 6G-FFT などのフルクトタン合成酵素と同じクレードに含まれた。1-SST などフルクトタン合成酵素は液胞型インベルターゼから、FEH のようなフルクトタン分解酵素は細胞壁型インベルターゼからそれぞれ進化したと考えられきたが、タマネギの 6G&1-FEH は既知の植物 FEH とは異なる進化を経ていることが示唆された。これまで、実際にフルクトタン代謝に関わる酵素の細胞内局在を詳細に研究した例はなかった。そこで、タマネギの 1-SST、6G-FFT そして 6G&1-FEH に DsRed をつなげた融合タンパク質をタバコ培養細胞 BY2 で発現させ、酵素の細胞内局在を調べた。その結果、タマネギ 6G&1-FEH-DsRed を発現している BY-2 の赤色蛍光は液胞で確認された (図 3)。また、1-SST や 6G-FFT を DsRed と融合させて発現させた BY-2 も、液胞での赤色蛍光を示した。このことから、タマネギにおけるフルクタンの合成と分解に関わる酵素はどちらも液胞に局在することが分かった。

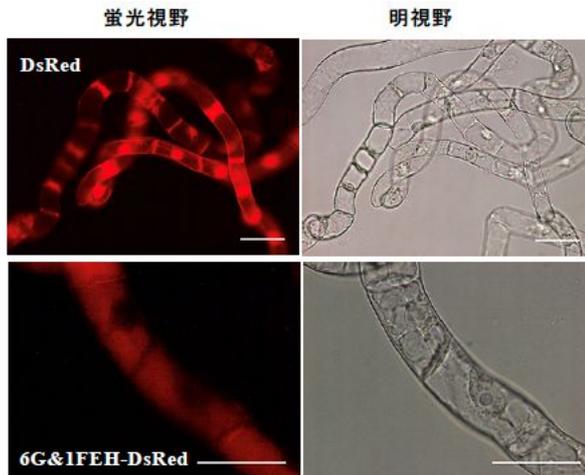


図3. タマネギ6G&1-FEHの細胞内局在

タマネギ由来FEHとDsRedを融合させたタンパク質をタバコBY2で発現させた。DsRed単独で発現しているBY-2では赤色蛍光が核や細胞質で確認できるが、6G&1FEH-DsRed発現BY-2の赤色蛍光は液胞で確認された。Bars = 50 μ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oku S, Ueno K, Tsuruta Y, Jitsuyama Y, Suzuki T, Onodera S, Maeda T, Shimura H	4. 巻 247
2. 論文標題 Sugar accumulation and activities of enzymes involved in fructan dynamics from seedling to bulb formation in onion (<i>Allium cepa</i> L.)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientia Horticulturae	6. 最初と最後の頁 147-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scienta.2018.12.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueno K, Sonoda T, Yoshida M, Shiomi N, Onodera S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Purification, characterization, and functional analysis of a novel 6G&1-FEH mainly hydrolyzing neokestose from asparagus.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 4295-4308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 奥聡史, 前田智雄, 平川直人, 平野里美, 佐々木雄輝, 村木美保, Wambraw Daniel Zdrak, 小山内祥代, 本多和茂, 鈴木卓, 山崎篤	4. 巻 17
2. 論文標題 青森県におけるタマネギ春まき作型に適した品種評価	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 園芸学研究	6. 最初と最後の頁 359-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda T, Watanabe A, Wambraw DZ, Osanai S, Honda K, Oku S, Shimura H, Suzuki T, Yamasaki A, Okabe Y, Ueno K, Onodera S.	4. 巻 86
2. 論文標題 Analysis of varietal differences in the fructo-oligosaccharide accumulation profile among onion (<i>Allium cepa</i> L.) cultivars grown by spring-sown cultivation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 501-510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶田春佳、上野敬司、高木惇生、奥山正幸、田上貴祥、木村淳夫、義平大樹、小野寺秀一
2. 発表標題 タマネギのフルクトオリゴ糖分解に関わる酵素の性質
3. 学会等名 令和2年度日本応用糖質科学会北海道支部シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥聡史、鶴田遊、上野敬司、小野寺秀一、前田智雄、実山豊、鈴木卓、志村華子
2. 発表標題 タバコプロトプラストを用いたタマネギ由来フルクタン代謝遺伝子の機能解析
3. 学会等名 園芸学会平成30年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野敬司、相田裕貴、奥聡史、志村華子、前田智雄、実山豊、鈴木卓、小野寺秀一
2. 発表標題 タマネギ由来フルクトオリゴ糖分解酵素の探索
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成30年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上野 敬司、相田裕貴、奥聡史、志村華子、前田智雄、実山豊、鈴木卓、小野寺秀一
2. 発表標題 タマネギ由来フルクトオリゴ糖分解酵素の組換タンパク質の性質
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥聡史, 志村華子, 鶴田遊, 上野敬司, 小野寺秀一, 前田智雄, 実山豊, 鈴木卓
2. 発表標題 タマネギ鱗茎のフルクトオリゴ糖蓄積に及ぼすフルクタン代謝解析
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥聡史, 志村華子, 前田智雄, 実山豊, 鈴木卓
2. 発表標題 MALDI-TOF Imaging MSを利用したタマネギ鱗茎におけるフルクタン分布の可視化
3. 学会等名 園芸学会平成29年度秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥聡史, 志村華子, 鶴田遊, 上野敬司, 小野寺秀一, 前田智雄, 実山豊, 鈴木卓
2. 発表標題 タマネギ鱗茎のフルクトオリゴ糖蓄積に及ぼすフルクタン分解系の影響
3. 学会等名 平成29年度北海道園芸研究談話会研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野敬司, 大嶋智美, 米田麻衣子, 塩見徳夫, 小野寺秀一
2. 発表標題 アスパラガス根のフルクタン加水分解酵素(FEH)の四,五糖類に対する作用
3. 学会等名 日本応用糖質科学会平成29年度大会(第66回)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上野敬司, 四月朔日新, 藤田樹里, 吉田みどり, 園田高広, 小野寺秀一
2. 発表標題 アスパラガス由来フルクタン加水分解酵素遺伝子の機能及び発現解析
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 四月朔日新, 上野敬司, 吉田みどり, 園田高広, 小野寺秀一
2. 発表標題 アスパラガス伏せ込み促成栽培根株の冷蔵処理時の貯蔵根糖含量と代謝関連遺伝子の変動
3. 学会等名 園芸学会平成30年度春季大会
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	上野 敬司 (Ueno Keiji) (90441964)	酪農学園大学・農食環境学群・准教授 (30109)	
研究分担者	前田 智雄 (Maeda Tomoo) (90530478)	弘前大学・農学生命科学部・教授 (11101)	

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