

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06021

研究課題名(和文) アスパラガスの萌芽にフルクタン代謝機構の果たす役割

研究課題名(英文) The role of fructan metabolism in the roots for the emergence of asparagus spears

研究代表者

上野 敬司 (Ueno, Keiji)

酪農学園大学・農食環境学群・准教授

研究者番号：90441964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラガスの萌芽のエネルギーとなるフルクタンがどのように分解、合成されるのか調べた。萌芽前後の地下部を採取し、フルクタン量やその代謝酵素活性・遺伝子発現変動を調べた。アスパラガスの萌芽時期のフルクタンの減少に伴って、貯蔵根での合成酵素活性及びその遺伝子(aoft1, 2, 3)の低下によりフルクタン合成が抑制すること、貯蔵根での分解酵素遺伝子(aoeh4)の増加によりフルクタン分解酵素活性が促進することを明らかとした。またaoeh4の他にaoeh3や7遺伝子がフルクタン分解に協同して関わり、また貯蔵根に隣接する地下茎においてもフルクタン代謝が行われている可能性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスパラガスの萌芽の準備として貯蔵根のフルクタンはまずaoeh4の作用により徐々に低分子化され、その後、貯蔵根もしくは地下茎でaoeh3やaoeh7遺伝子の翻訳産物により分解されることが考えられた。アスパラガスの萌芽・収量は品種や栽培の状況、環境ストレスなどの要因により強く影響を受ける。本研究により明らかとした異なるフルクタン代謝酵素による協同でのフルクタン分解が、萌芽・収量に影響を与える各種の要因と関係するのかどうかを、今後明らかとすることで、アスパラガスの高品質な品種の育成や栽培管理の検討等の基盤となる情報を積み重ねることが可能となり、今後の研究展開と考えている。

研究成果の概要(英文)：Fructan is the energy source for emergence of asparagus spears. We investigated how fructan is metabolized by several fructan metabolizing enzymes. The underground part of asparagus before and after emergence of spears was collected, and the fructan content and its metabolic enzyme activity and gene expression were analyzed. With the decrease of fructan during the emergence period of asparagus, fructan synthesis was suppressed by the decrease of fructosyltransferase activities and these gene expressions (aoft 1, 2, 3) in the storage root. Moreover, increase of the aoeh4 gene expression raised fructan-degrading enzyme activity. Our results showed that not only aoeh4 but also aoeh3 and 7 genes may be involved in fructan degradation in root and rhizome adjacent to root.

研究分野：園芸学・植物生理学

キーワード：アスパラガス フルクタン フルクタン加水分解酵素 フルクタン合成酵素 フルクトオリゴ糖 ケストース 萌芽

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスパラガスは貯蔵根に貯蔵糖としてフルクタンを蓄積する。アスパラガス収穫期に、フルクタンが分解され、可食部である若茎の萌芽のエネルギーとなる。これまでにこの分解に関わる新規酵素としてフルクタン加水分解酵素 6G&1-FEH を見出し、アスパラガス若茎の萌芽に関わる酵素の一つであることを報告した。しかしながら、この他にもフルクタン代謝酵素と予想される遺伝子が複数存在していた。このため、研究開始当初は、若茎萌芽のためのエネルギー生産の詳しいメカニズム解明の手がかりは掴んでいたものの完全な理解にはまだ至っていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究では複数存在するアスパラガスのフルクタン代謝関連酵素の候補遺伝子の機能解析・発現変動解析を行い、アスパラガスのフルクタン代謝酵素群がフルクタンの分解、合成をどのように行うのか？ これらの酵素遺伝子がアスパラガス生育期間中にどのように変動するのか？を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) アスパラガス萌芽期間のフルクタン量、遺伝子発現、酵素活性変動の解析

アスパラガスを栽培し、2ヶ月苗のポット栽培株および農業現場のモデルとして1.5年株を用い、若茎の萌芽前後のアスパラガス地下部を採取し実験に使用した。この間のフルクタン代謝関連酵素遺伝子の発現変動をリアルタイムPCRで測定した。また1.5年株の材料からは糖及び酵素タンパク質を抽出し、各種の糖・フルクタン量とその合成及び分解酵素活性を測定し、萌芽期間中の変動を調査した。各糖の分析にはHPAEC-PAD法を用いた。総フルクタン量は酵素法を用いフルクタンナーゼ分解産物の量から計算した。

(2) アスパラガスのフルクタン代謝関連酵素遺伝子の機能解析

フルクタンの合成や分解に関わる酵素は酸性インペルターゼ(液胞型と細胞壁型)とともにグリコシドヒドロラーゼファミリー32(GH32)に属しており、アスパラガスのゲノムシークエンス中にはGH32に該当する酵素遺伝子を検索すると複数の遺伝子が検索される。これらの組換えタンパク質を*Pichia pastoris*を用いて作製し、その酵素活性を評価した。

4. 研究成果

(1) アスパラガス萌芽期間の貯蔵根におけるフルクタン量、遺伝子発現、酵素活性変動

1.5年株のアスパラガス根株を用いて、若茎を萌芽させ、この期間中の貯蔵根のフルクタン、フルクトオリゴ糖量の推移を調べたところ、萌芽・収穫期間にフルクタン及び各重合度のフルクトオリゴ糖量が減少した。この萌芽期間には *aoeh4* 遺伝子並びにその翻訳産物であるフルクタン加水分解酵素 6G&1-FEH の活性が増加した。その一方でフルクタン合成活性が減少し、またその酵素遺伝子である *aoft1,2,3* の発現量は萌芽開始前よりも低い値を示した。このことから新たなフルクタン合成が抑制・停止することが考えられ、この抑制がアスパラガス萌芽のための貯蔵根フルクタンの消費に間接的に関与していることが考えられた。

2ヶ月間ポット栽培したアスパラガス貯蔵根においても同様に萌芽期間の遺伝子変動を調べたところ、1.5年株での試験と同様の変動を示した。また *aoeh4* 以外に複数存在するフルクタン加水分解酵素候補遺伝子 *aoeh1,2,3,5,6,7*, *aoinv* についても調査したところ *aoeh3*, 及び7遺伝子の発現量が他よりもやや高く推移しており、*aoeh4* とともにフルクタン分解を担う可能性が考えられた。

(2) アスパラガス萌芽期間の地下茎におけるフルクタン量、遺伝子発現、酵素活性変動

前述の(1)の試験において貯蔵根でのフルクタン分解に *aoeh4* 及び3, 7が協同して関与する可能性が示され、他の候補遺伝子については萌芽時の貯蔵根においては機能していないことが考えられた。そこで調査範囲を広げ、貯蔵根が隣接している地下茎について同様に調査した。

アスパラガスには新たに栽培した1.5年株を用い、貯蔵根だけでなく地下茎も採取した。貯蔵根の糖含量の変動は、(1)の結果と類似した。このときの地下茎においても *aoeh4* 及び3, 7遺伝子の発現量が他の遺伝子よりも高い値を推移した。また *aoeh4* 遺伝子は萌芽・収穫時期が進むにつれて貯蔵根での発現量が増加する傾向を示すが地下茎では反対に減少する傾向であった。一方、萌芽・収穫時期が進むにつれて地下茎の *aoeh3*, 7遺伝子の発現量が増加する傾向を示し

た(図1)。

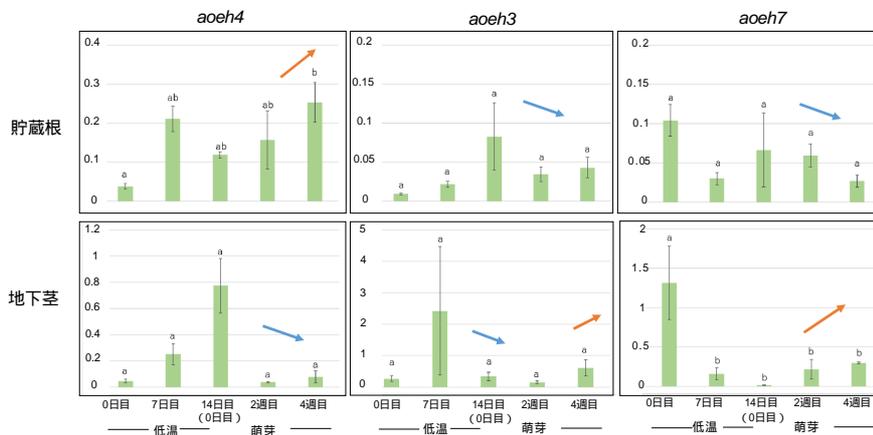


図1. *aoeh4,3,7* 遺伝子の発現変動

X軸：低温遭遇期間(日)、萌芽期間(週) Y軸：相対遺伝子量 目的遺伝子/EF1
異なるアルファベットはサンプル間で有意差があることを示す

aoeh4:フルクタン加水分解酵素6G&1-FEHをコードする遺伝子 (Ueno *et al.* 2018)
*aoeh3*および7:スクロースおよびフルクタン加水分解酵素をコードすると推定される遺伝子

地下茎のフルクタン含量を調べたところ、重合度の低いフルクタン(DP3-5)が主に検出され、萌芽期間中の含有量に大きな変動は見られなかったが各サンプルにおいて貯蔵根の10分1程度の含有量で存在していることがわかった(図2)。

地下茎及び貯蔵根から調製した粗酵素液のフルクタン分解活性を測定したところ、地下茎において低分子フルクタンの1-ケストースやニストースを分解する酵素活性が検出され、また貯蔵根よりも高い値を示した。これらのことから貯蔵根だけでなく地下茎においてもフルクタン代謝が行われている可能性を見出すことができた。

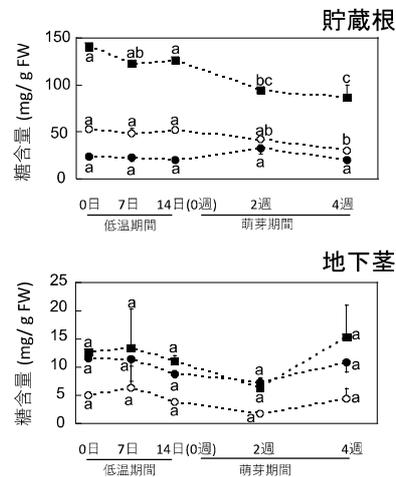


図2. 貯蔵根と地下茎のフルクタン含量の変動

●●● 重合度(DP)3-5の合計量
○○○ DP6-9の合計量
■ ■ ■ 総フルクタン量

異なるアルファベットはサンプル間で有意差があることを示す

(3) アスパラガスのフルクタン代謝関連酵素遺伝子の機能解析

インベルターゼやフルクタン代謝酵素を含む GH32 グループに該当する酵素遺伝子のうち、まだ報告されていなかった *aoft2*, *aoft3*, *aoinv*, *aoeh3*, *aoeh7* 遺伝子の組換えタンパク質を *Pichia pastoris* を用いて作製し、その酵素活性を評価した。その結果、*aoft2* 及び 3 遺伝子はそれぞれフルクタン合成酵素(1-FFT, 1-SST)をコードしていた。*aoinv* についてはスクロースを加水分解するインベルターゼであった。また低分子フルクタンである 1-ケストースやニストースもスクロースほどではないが加水分解した。*aoeh3*, 7 については、残念ながら組換えタンパク質を得るに至らなかった。系統樹解析、アミノ酸配列の相同性から細胞壁型インベルターゼもしくはフルクタン加水分解酵素 FEH であると推定された。前述の(2)の地下茎における酵素活性測定からフルクタン分解には *aoinv* が関わる可能性もあるが遺伝子発現解析から *aoeh3*, 7 が関与する可能性も高く今後の調査の継続が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 上野 敬司, 園田 高広, 吉田 みどり, 川上 顕, 塩見 徳夫, 小野寺 秀一	4. 巻 12(2)
2. 論文標題 アスパラガス収穫期の養分消費を担うフルクタン加水分解酵素	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 応用糖質科学	6. 最初と最後の頁 -
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno Keiji, Sonoda Takahiro, Yoshida Midori, Kawakami Akira, Shiomi Norio, Onodera Shuichi	4. 巻 156
2. 論文標題 Decreased expression of fructosyltransferase genes in asparagus roots may contribute to efficient fructan degradation during asparagus spear harvesting	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 192 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plaphy.2020.09.007	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山 莉瑚, 新海 想, 小島 琴那, 園田 高広, 小野寺 秀一, 上野 敬司
2. 発表標題 アスパラガス地下部の部位ごとのフルクトオリゴ糖含量とその代謝酵素遺伝子の変動
3. 学会等名 令和3年度日本応用糖質科学会北海道支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北本 美穂, 多田 和音, 児玉不二雄, 園田高広
2. 発表標題 アスパラガス伏せ込み促成栽培における根株貯蔵条件が若茎の軟弱腐敗の発生に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会令和3年度 秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芝木致嘉, 佐々木宥人, 園田高広
2. 発表標題 ポット苗を用いたアスパラガス育成系統の休眠特性および低温伸張性の評価
3. 学会等名 園芸学会令和3年度 秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 敬司, 園田 高広, 吉田 みどり, 川上 顕, 塩見 徳夫, 小野寺 秀一
2. 発表標題 アスパラガス収穫期の養分消費を担うフルクタン加水分解酵素
3. 学会等名 応用糖質科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水こはる, 吉田彩乃, 園田高広, 小野寺秀一, 上野敬司
2. 発表標題 アスパラガス地下部のフルクトオリゴ糖分解酵素遺伝子の探索
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 園田高広, 浅田康多, 上野敬司
2. 発表標題 伏せ込み促成栽培における紫アスパラガス新品種の特性評価
3. 学会等名 園芸学会令和3年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園田高広, 中山恭輔, 上野敬司
2. 発表標題 紫アスパラガスおよび伏せ込み促成栽培用品種の休眠特性
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上野敬司, 吉田みどり, 川上顕, 園田高広, 塩見徳夫, 小野寺秀一
2. 発表標題 アスパラガス収穫期の貯蔵根のフルクトオリゴ糖含量変動とその代謝関連酵素活性及び遺伝子の変動
3. 学会等名 園芸学会令和元年度 秋季大会
4. 発表年 2019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	園田 高広 (Sonoda Takahiro) (60621498)	酪農学園大学・農食環境学群・教授 (30109)	

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