

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580501

研究課題名(和文) コムギのフルクタン分解酵素遺伝子群による越冬エネルギーの効率的利用機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of role of fructan exohydrolase genes in efficient use of wintering energy of wheat

研究代表者

吉田 みどり (YOSHIDA, Midori)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・寒地作物研究領域・主任研究員

研究者番号：00355455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハードニング中および越冬中のフルクタン蓄積量はコムギの耐凍性と雪腐病抵抗性に強く関わる。近年、異なった基質特異性をもつコムギのフルクタン分解酵素遺伝子(FEH)が幾つか単離された。自然環境下で生育したコムギ組織において、1-FEH, 6-KEH, 6&1-FEH, 6-FEH, Wfh-sm3遺伝子発現の季節変化を解析したところ、発現変化は遺伝子によって異なった。その中で、コムギのフルクタンの全ての組成を分解する酵素をコードするWfh-sm3遺伝子の発現量は、フルクタン含量の季節変化に関係していた。これらの遺伝子の発現制御が越冬中の環境ストレスに対する品種間差異に重要な役割を担うと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In autumn, winter wheat accumulates fructan, which is a kind of fructose-based oligo- and polysaccharide with high hydrophilicity, and the content of fructan in wheat is associated with both freezing tolerance and snow mold resistance. Recently, we cloned several kinds of genes encoding FEH (fructan exohydrolase) from wheat, and analyses of their substrate specificities revealed that various FEHs, including 1-FEH, 6-FEH, 6-KEH (kestose exohydrolase) and 6&1-FEH, exist in wheat plants. Analysis of gene expression of these FEHs during a wintering period showed that seasonal changes in mRNA levels were different among genes. Seasonal changes and varietal difference in expressions of FEH genes might also play an important role in tolerance to environmental stresses during wintering.

研究分野：植物生理学

キーワード：フルクタン 糖代謝 コムギ 耐凍性 雪腐病抵抗性

1. 研究開始当初の背景

(1) 北海道の主要作物である秋播きコムギや寒地型イネ科牧草の越冬能力の改良には、耐凍性と積雪下で蔓延する糸状菌類に対する雪腐病抵抗性(耐雪性)の双方の耐性の向上が必要とされる。近年、北海道では、冬期の気象変動が激しく、温暖化による根雪前や積雪後の大量の降雨による防除の困難や氷結といった新たな問題にも曝されており、高度な耐凍性と雪腐病抵抗性の付与が引き続き求められている。フルクタン(fructan)はスクロースにフルクトースが重合した水溶性のオリゴ糖と多糖の総称で、麦類や寒地型牧草ではデンプンに代わる主要エネルギー源として利用されている。これらの植物は秋から根雪前の低温順化(ハードニング)時にフルクタンを組織に大量に蓄積するが、その蓄積量が越冬性に強く関わる。長期積雪下で冬越しするエネルギー源であるフルクタンの代謝機構の解明がコムギを含む麦類・寒地型イネ科牧草の越冬性の向上において極めて重要である(Yoshida & Tamura, 2011)。

(2) 研究代表者を中心としたグループでは、主にコムギの耐凍性・雪腐病抵抗性の研究の過程で、コムギのフルクタンの蓄積量と両耐性の品種間差異を明らかにした(Yoshida et al. 1998)。以降、世界に先駆けて、コムギ及び寒地イネ科牧草から、これらに蓄積される分岐型のフルクタン合成・分解に関わる酵素遺伝子群を単離してきた(合成酵素遺伝子: Kawakami & Yoshida 2002, 2005, Tamura et al. 2009、分解酵素遺伝子: Van den Ende et al. 2003, 2005、Kawakami et al. 2005、Tamura et al. 2011、Kawakami & Yoshida 2011)。麦類・寒地型イネ科牧草が、デンプンではなくフルクタンを蓄積糖として生長する生理的意義には幾つかのことが存在するが、越冬のエネルギー代謝に関して、以下のような合理的側面が存在する。フルクタンは幾つかの種類のフルクタン合成酵素によって、スクロースを基質として、フルクトース転移によって合成されるが、その酵素反応にリン酸化物質等のエネルギー物質を必要とせず、フルクタンを重合しながらグルコースを供給する。フルクタンは液胞で合成されるため、重合することで、浸透圧に大きな影響を及ぼさずに大量に蓄積できる。一方で、フルクタンをエネルギー源として直接利用するには分解酵素が働き、フルクタンの末端のフルクトースを加水分解して供給する。合成、分解反応の双方から直接単糖が供給され、この糖が耐凍性向上やエネルギーに素早く利用されるという、限られた光合成期間と過酷な環境に適応したエネルギー代謝機構が備わっている。

コムギ等はハードニング中の低温に敏感に反応し生長を抑え(休眠応答)、根雪前の凍結環境や積雪下での長期暗黒環境下を生存する。また、雪腐病菌感染に应答するなどの様々な環境変化に应答しなければならない。秋から春までのフルクタン蓄積量の大きな変化は合成と分解の双方のバランスの違いによってもたらされる。我々のこれまでの研究で、コムギ等の分岐型フルクタンを蓄積する植物には多数の酵素機能(結合切断部位と基質)の異なる分解酵素遺伝子が存在することが分かってきた。これらの分解酵素群は、組織や環境によって発現様式が異なり、上記の複雑な越冬の営みをコントロールしていることが推察される。此まで単離されている遺伝子群の発現を解析し、フルクタン代謝によるコムギの越冬エネルギー蓄積・利用の調節機構を分子生物学的に明らかにすることが、コムギを含む麦類・寒地型イネ科牧草の耐凍性と雪腐病抵抗性の解明に寄与する。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題は、北海道の主要作物である秋播きコムギや寒地型イネ科牧草の越冬能力の改良のため、越冬中のコムギ品種組織の蓄積糖フルクタンの合成酵素遺伝子(2種類)と分解酵素遺伝子(4種類)の遺伝子発現変化を解析し、フルクタン代謝によるコムギの越冬エネルギー蓄積・利用の調節機構を分子生物学的に明らかにする。特に高度耐凍性と高度雪腐病抵抗性(耐雪性)レベルでは異なる方向に分化しているフルクタン代謝の調節機構を司るキー酵素遺伝子を特定することにより、コムギを含む麦類・寒地型イネ科牧草の耐凍性と雪腐病抵抗性の向上に寄与する。

3. 研究の方法

(1) 育成、サンプリング方法

2008年と2009年9月に耐凍性、雪腐病抵抗性の異なる秋播きコムギ4品種(耐凍性強雪腐病抵抗性弱品種, Norstar と Valuevskaya; 耐凍性弱雪腐病抵抗性強品種, PI173438; 中間品種、チホクコムギ)を圃場に播種し、自然条件下で育てた。根雪前に雪腐病防除を行い、10月初旬から4月初旬(雪解け)まで定期的にサンプリングした。個体を葉とクラウン組織に分け、実験使用まで-80℃で保存した。

(2) 可溶性糖含量測定

サンプリング組織は糖抽出まで-80℃凍結状態で保存した。得られた組織1gを細かく裁断し、内部標準として1mg/mlのプロ

ピレングリコールを含む蒸留水で煮沸抽出し、抽出液を0.45 μmのフィルターで濾過した。糖含量はRI検出を用いたHPLCで測定した。カラムはShodex KS802とKS803を連結したものをを用い、カラム温度50、移動相を水とし0.8ml/minで分離し、フルクトース、グルコース、スクロース、フルクタン量に分け測定した。

(3) RNA 抽出と Real-time PCR による遺伝子発現解析

RNeasy Plant Mini kit (Qiagen USA, Valencia, CA) を用いコムギ組織からの RNA 抽出を行った。抽出した RNA 1 μg を DNase 処理した後、Oligo-dT₂₀ プライマーを用いて SuperScript III (Invitrogen) で逆転写し cDNA を合成した。RNA 5 ng 相当の cDNA を テンプレートとし、7300 Real-Time PCR system (Applied Biosystems) と SYBR Premix Ex Taq (TAKARA BIO Inc.) によって解析した。定量ターゲットはフルクタン分解酵素 5 遺伝子 (1-FEH, 6-FEH, 6-KEH, 6&1-FEH, Wfh-sm3) で、それぞれの基質特異性は表 1 に示す。これらの発現量を同じ組織のアクチン遺伝子を内性標準遺伝子として用い規格化した。解析は絶対定量法を用い遺伝子の増幅部位を pGEM-T easy vector にクローニングし、いくつかの希釈系列にておいて増幅し検量線を作成した。増殖曲線から得られた Ct 値を検量線に基づいて定量した。

表 1 解析コムギのフルクタン分解酵素遺伝子のコードする酵素の基質特異性

| | 1-FEH w1 | 6-KEH w1 | 6&1-FEH w1 | 6-FEH w1 | Wfh-sm3 |
|--------------------------|----------|----------|------------|----------|---------|
| Sucrose (DP2) | x | x | x | x | x |
| 1-Kestose (DP3) | ⊙ | x | Δ | x | Δ |
| 6-Kestose (DP3) | x | ⊙ | Δ | ⊙ | ⊙ |
| 1,1-Nystose (DP4) | ⊙ | x | Δ | x | ○ |
| Bifurcose (DP4) | x | x | ⊙ | - | ○ |
| Levan (high DP) β(2,6) | x | x | Δ | ⊙ | x |
| Inulin (high DP) β(2,1) | ○ | x | x | x | x |
| Wheat graminan (high DP) | - | x | Δ | Phlein ⊙ | ⊙ |

1-FEHw1: Van den Ende et al.2003.6-KEH: Van den Ende et al.2005.6&1-FEH: Kawakami et al.2005. 6-FEH: Van Riet et al. 2006. Wfh-sm3: Kawakami and Yoshida 2012.

4. 研究成果

(1) サンプル年間は 12 月上旬から 4 月初めまでの根雪期間であったが、コムギ品種の糖含量は根雪まで増加し、積雪下で減少した。異なる年 2 シーズンについて解析したが、全ての解析において、両年でほぼ同じ季節変化と品種間差異を示した。また、葉組織とクラウンにおいても傾向が同じであった。

(2) 可溶性糖含量の分析において、全ての品種で低温順化中の秋から根雪に掛けて単・二糖

類、オリゴ糖と多糖からなるフルクタン含量は増加し、積雪下で春までそれらの量は低下した。耐凍性品種 (Norster, Valuevskaya) はハードニング (低温順化) 中の単・二糖類蓄積量が高く、これらの糖が高い耐凍性に関係していると考えられる。しかしながら、積雪下でのフルクタンの消費速度が高かった。一方、雪腐病抵抗性品種 (PI 173438) はハードニング中のフルクタン蓄積量が他品種に比較して極めて高く、積雪下でのフルクタンの消費速度が低かった。その結果、春を迎える時期の糖含量は PI 173438 において高く、この性質が雪腐病抵抗性に寄与していると考えられる。上記の糖含量の変化と品種間差異は既報 (Yoshida et al. 1998) と一致した。

(3) 圃場越冬中のコムギ品種のフルクタン分解酵素遺伝子の発現を解析したところ、季節を通して、それぞれ 6-kestose (3 糖) とピフルコース (4 糖) に強い基質特異性をもつ 6-KEH, 6&1-FEH の発現量が長鎖を分解する酵素をコードする他の遺伝子よりも有意に高いレベルで発現していた。6&1-FEH は恒常的な発現変化を示し、雪腐病抵抗性品種の PI173438 で高い値で推移した。一方、コムギのフルクタンにおいてトリミング酵素と考えられている 1-FEH は発現量が低い耐凍性品種 (Valuevskaya, Norstar) で高く、雪腐病抵抗性品種の PI173438 で低い発現量で推移した。6-KEH, 6&1-FEH の発現量は他に遺伝子比較して 10 倍近く高いが、これらの遺伝子変化と品種間差異はコムギ組織におけるフルクタン含量の結果と一致しない。6-KEH はアポプラストに活性が見られると報告されていることから、これらの酵素の局在性が関係している可能性がある。

(4) コムギのフルクタンの骨格となる (2-6) 結合を切る 6-FEH は全ての品種でハードニング中に増加し、積雪下で減少した。この変化は、コムギ組織の単・二糖類の季節変化と相関した。12 月の凍結刺激時をのぞいて、この遺伝子の発現は耐凍性品種の方が PI173438 に比較して高かったことから、この遺伝子の発現が耐凍性に関わる単・二糖類の供給の役割を担っている可能性がある。

(5) Wfh-sm3 は気温の低下に従って発現が抑えられ、積雪下で徐々に増加し、2 月に最も発現が高かった。5 種類の遺伝子の中で、フルクタン含量の季節変化と一致する発現変化を示したのは Wfh-sm3 遺伝子であった。またこの遺伝子は品種間差異においても季節を通して、雪腐病抵抗性品種の

PI173438 で低く抑えられており、積雪下でも顕著な品種間差異を示した。Wfh-sm3 フルクトンの全ての組成を分解できる酵素をコードする。従って、越冬中のフルクタン含量の変化および品種間差異をもたらす要因の1つとしてWfh-sm3 遺伝子の発現量が関わることを示唆された。

< 引用文献 >

Kawakami, A. and Yoshida, M., Molecular characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and sucrose:fructan 6-fructosyltransferase associated with fructan accumulation in winter wheat during cold hardening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 2297-2305 (2002)

Kawakami, A. and Yoshida, M., Fructan:fructan1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*, 21:1-15 (2005)

Kawakami A, Yoshida M. and Van den Ende W., Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene*, 358:93-101 (2005)

Kawakami, A, Yoshida, M., Graminan breakdown by fructan exohydrolase induced in winter wheat inoculated with snow mold. *J. Plant Physiol.*, 169: 249-302 (2012)

Tamura, K. Sanada, Y. Tase, K. Komatsu, T. Yoshida, M., Pp6-FEH1 encodes an enzyme for degradation of highly polymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.) *J. Exp. Bot.*, 62: 3421-3431, (2011)

Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere A., Yoshida, M., Kawakami, A., Fructan 1-exohydrolase. β -(2,1)-trimers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiol.* 131, 621-631 (2003)

Van den Ende, W., Yoshida, M., Clerens S., Vergauwen, R., and Kawakami, A.

Cloning, characterization and function analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*), *New Phytol.* 166,917-932(2005)

Van Riet L, Nagaraj V, Van den Ende W, Clerens S, Wiemken A, Van Laere A., Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Exp. Bot.* 7(1):213-23 (2006)

Yoshida, M. Tamura, K., Research on fructan in wheat and temperate grasses in Japan. *JARQ.* 45:9-14(2011)

Yoshida M, Abe J, Moriyama M and Kuwabara T, Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.* 103: 8-16, (1998)

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

Midori Yoshida, Fructan metabolism associated with freezing tolerance and snow mold resistance of winter wheat in Hokkaido. NARO/HARC International Seminar on Molecular Biology for Stress Tolerances in Rice and Upland Crops Program & Abstract, p11, 2014年10月29日, かでる2.7(北海道・札幌)

吉田みどり, 目黒文乃, 川上顕, 秋播きコムギの雪腐病抵抗性に関するフルクタン分解酵素遺伝子、日本植物学会第77回大会研究発表記録, p219, 2013年9月15日, 北海道大学(北海道・札幌)

Midori Yoshida, Akira Kawakami, Molecular Analysis of fructan metabolism associated with freezing tolerance and snow mold resistance of winter wheat. *Plant and Microbe Adaptation to Cold 2012*, Abstract, p36, 2012年6月27日, 北海道大学(北海道・札幌)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 みどり (YOSHIDA, Midori)

独立行政法人農業・食品産業技術総合
研究機構・北海道農業研究センター・
寒地作物研究領域・主任研究員
研究者番号：00355455