

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850023

研究課題名(和文) ゲンチオオリゴ糖の成長相転換シグナルとしての機能解析

研究課題名(英文) Study of functions of gentio-oligosaccharides as signal of growth phase transition

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) 3,400,000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におけるゲンチオオリゴ糖の相転換シグナルとしての作用機序の解明を目指した。休眠期における相転換関連遺伝子の発現と、ゲンチオオリゴ糖の蓄積には一部相関が観察された。特にゲンチオピオースと相関が見られた遺伝子についてリンドウ越冬芽で高発現を試みたところ萌芽が誘導されたことから、越冬芽の休眠制御にこれら遺伝子が関与することが明らかとなった。また、cDNAライブラリーを用いた遺伝子選抜並びに標識糖を用いたトレーサー実験から、ゲンチオオリゴ糖代謝に関与が予想される遺伝子及び代謝物の検出に成功した。これらを詳細に解析することで本代謝経路の解明に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Gentians, herbaceous perennial plants, can survive winter by producing overwintering buds (OWBs). OWBs enter dormancy prior to winter, and sprout when spring comes. In this study, we focused oligosaccharide signaling during dormancy to elucidate mechanisms regulating phase transition of dormancy in OWBs. We found that there was a relationship between oligosaccharide concentrations and expression levels of phase transition-related genes. Overexpression analysis in OWBs revealed that some of the genes are involved in the regulation of dormancy in OWBs, suggesting that the oligosaccharides seem to affect dormancy phase through modification of the expression of phase transition-related genes. Furthermore, we identified genes and metabolites probably related to the oligosaccharide pathways by cDNA library screening and tracer analysis using labeled sugars.

研究分野：農学

キーワード：花卉 休眠 リンドウ メタボローム解析

### 1. 研究開始当初の背景

植物は、花成と呼ばれる相転換を行い、生殖により種子を結実させることで後代へと子孫を残す。他方、複数年に渡って生存する多年生植物は、花成以外に休眠という相を持ち、植物体そのものが形態や代謝を変化させることで、生育に不適な環境下でも生存できる。多年生植物であるリンドウ (*Gentiana triflora*) の研究から、冬芽の休眠過程で『ゲンチオオリゴ糖』と呼ばれる糖類が顕著に変動することが明らかとなっている。さらに、通常は器官培養系で打破されない休眠が、ゲンチオオリゴ糖の一種であるゲンチオピオース (Gen2) 処理で打破されることが見出されており、本オリゴ糖は休眠打破のシグナルとして働く可能性が示された。また、冬芽の休眠過程では、相転換に関わる遺伝子群が休眠を調節することが報告されている<sup>1),2)</sup>。これら遺伝子の発現変動と Gen2 には高い相関が見られ、さらに光調節によって遺伝子発現が誘導される際にも、Gen2 蓄積が誘導されることから、相転換遺伝子と G2 は同じシグナル伝達経路にあり、これらの相互作用によって休眠が調節されている可能性が見出されている。

参考文献 1) Rohde A et al. (2007) *Trends Plant Sci.*, 12, 217. 2) Horvath D. (2009) *Plant Sci.*, 177, 523.

### 2. 研究の目的

本研究では、未知であるゲンチオオリゴ糖の代謝経路と、シグナルとしての作用機序を解明することで、植物の成長相を調節する新規機構を明らかにする。リンドウの相転換遺伝子を単離し、それら遺伝子の高発現及び抑制がゲンチオオリゴ糖に与える影響を調査する。また、本オリゴ糖が相転換遺伝子や代謝全体に与える影響を明らかにすることで、相転換を促すシグナル伝達の実態を分子レベル・代謝レベルで明らかにする。さらに、ゲンチオオリゴ糖を分解・合成する酵素を中心とした代謝経路を特定から、本オリゴ糖組成を調節する分子機構を解明し、相転換調節技術の基礎研究とする。

### 3. 研究の方法

#### ゲンチオオリゴ糖のシグナル機能の解明

ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の作用機序及び局在し作用する部位を明らかにし、本オリゴ糖の相転換シグナルとしての機能を証明する。

#### -A 休眠期における相転換遺伝子の挙動解析

花成期には *FT* や *FLC*、休眠期には *DAM* や *VIN3* 等の遺伝子が作用することが知られている。これら遺伝子を EST 情報を基に単離し、リンドウの相転換期の挙動を調査する。

#### -B ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の相互作用の探索

単離した相転換遺伝子を、ウイルスベクター (ALSV) を用いてリンドウの器官培養物で高発現または発現抑制し、ゲンチオオリゴ糖を中心としたメタボローム解析を行う。逆に、器官培養物に G2 及び G3 を処理し、これら遺伝子への影響を調査することで、本オリゴ糖と相転換遺伝子の作用機構と代謝への影響を明らかにする。

#### -C 相転換遺伝子とゲンチオオリゴ糖の作用領域の特定

*FT* 等の相転換遺伝子は、葉や茎頂等の器官別に特徴的な発現パターンを示す。そこで、開花期のリンドウの茎頂及び休眠期の冬芽において、相転換遺伝子の組織局在を明らかにする。他方、ゲンチオオリゴ糖の局在を調査し、両因子の蓄積パターンを比較することで、細胞内で作用する部位を特定する。

#### ゲンチオオリゴ糖を調節する代謝経路の探索

ゲンチオオリゴ糖のシグナル機能を理解するには、本オリゴ糖の代謝経路を明らかにする必要がある。そこで、ゲンチオオリゴ糖代謝に属する代謝物と酵素を網羅的に探索する。

#### -A cDNA library を用いたゲンチオオリゴ糖代謝酵素の網羅的検索

リンドウの cDNA library を用いて、ゲンチオオリゴ糖代謝酵素を探索する。SMART 法で作成した完全長 cDNA 群を恒常発現ベクターを用いて酵母で発現させる。形質転換酵母を G2 または G3 を唯一の炭素源とする培地で選抜後、導入された遺伝子の配列を得る。通常、酵母はこれらオリゴ糖を利用できないため、選抜された酵母はリンドウに由来するゲンチオオリゴ糖代謝酵素を有することが期待できる。得られた遺伝子はピキア酵母に導入し、産生させた組換え蛋白質でゲンチオオリゴ糖を基質とする活性を調査する。さらに、開花期と休眠期における遺伝子発現を経時的に解析し、本オリゴ糖調節との関与を証明する。

#### -B 標識糖を用いたトレーサー解析

安定同位体  $^{13}\text{C}_6$  グルコースを取り込んだリンドウ培養細胞は、 $^{13}\text{C}_6$  ゲンチオオリゴ糖を蓄積することから、グルコースを起点とする経路は確実に存在する。そこで、培養細胞に  $^{13}\text{C}_6$  グルコースを取り込ませた後、経時的にメタボローム解析を行うことで、グルコースからゲンチオオリゴ糖に至るフラックスを調査し、本オリゴ糖の合成経路を特定する。

#### 4. 研究成果

##### ゲンチオオリゴ糖のシグナル機能の解明

ゲンチオオリゴ糖と相転換遺伝子の作用機序を明らかにするため、休眠期に作用すると予想される相転換遺伝子群を単離し、自発休眠から萌芽までの発現変動を調査した(図1)。2遺伝子は、他発休眠期に減少し萌芽期に増加し、Gen2と類似した挙動が観察された。逆に、自発休眠期に発現量が高く、他発休眠期及び萌芽期に減少した遺伝子は、前述の遺伝子を負に制御する可能性が見出された。また、MYC転写因子やホルモン関連遺伝子についても発現解析を行なった。自発休眠から他発休眠への移行期に発現変動が観察されたが、萌芽との明確な関与は見出されなかった。

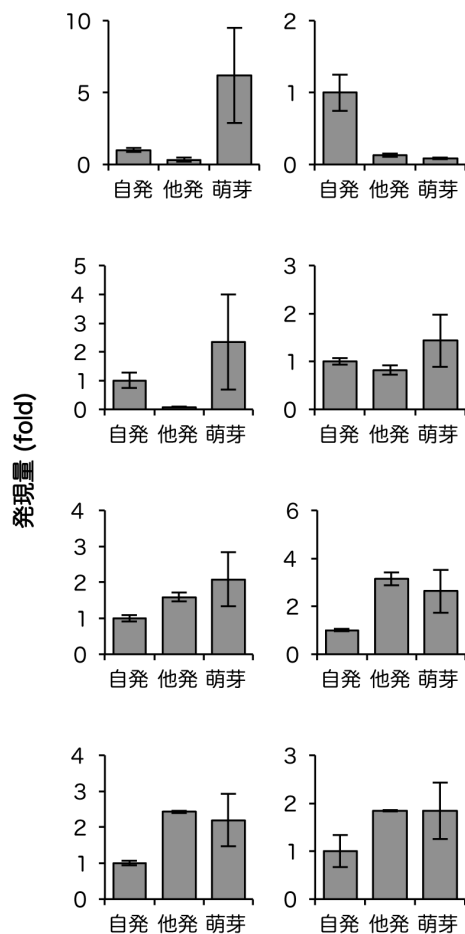


図1 相転換遺伝子の発現解析  
自発休眠：自発、他発休眠：他発

次に、萌芽期に増加した相転換遺伝子について、越冬芽における高発現を試みた。ALSVベクターを用いて発現させる条件を検討し、効率的な導入条件を確立した。本条件を用いて露地越冬芽で発現させたところ、処理後7日目で萌芽が観察された(図2)。この際、Gen2蓄積には有意な変化は見られなかった。今後、高発現体をメタボローム解析することで代謝全体への影響を調査する予定である。

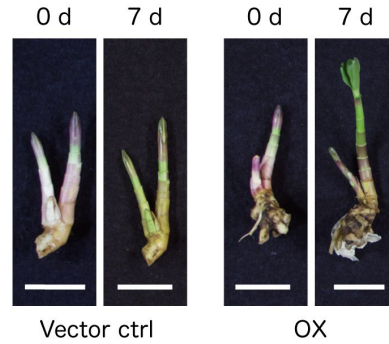


図2 相転換遺伝子の高発現による萌芽誘導

相転換遺伝子と Gen2 の相互作用を明らかにするため、越冬芽における局在を調査した。越冬芽を茎頂上部、茎頂基部、葉に分け、それぞれの部位で相転換遺伝子の発現と Gen2 の蓄積を経時的に調査した(図3)。遺伝子発現は、茎頂上部と基部で同様のパターンを示し、萌芽期にのみ高い発現が観察された。一方、葉では自発休眠初期と萌芽期で高い発現が観察された。Gen2 の蓄積を TLC で解析したところ、遺伝子発現と類似した蓄積パターンが観察された。以上の結果から、越冬芽において本相転換遺伝子の発現と Gen2 の蓄積には相関関係があることが明らかとなった。しかし、明らかな作用領域は存在せず、越冬芽全体で作用することが予想された。

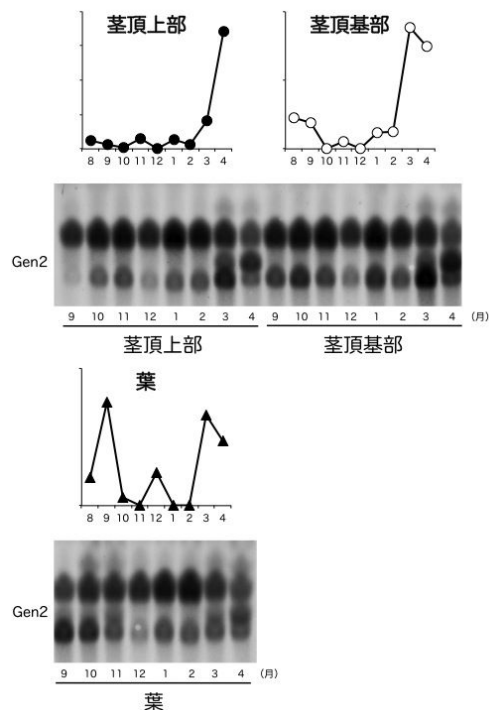


図3 相転換遺伝子発現と Gen2 蓄積の局在

## ゲンチオオリゴ糖を調節する代謝経路の探索

酵母を用いた遺伝子選抜により、1 遺伝子が見出された。本遺伝子はインペルターゼと相同性を示した。本遺伝子の機能を明らかにするため大腸菌による融合タンパク質発現を試みたが発現は困難であった。そこで、ピキア酵母による発現を試みたところ、予想されたサイズの融合タンパク質が検出された。そこで、DEAE カラムを用いて精製を行なった(図4)。本タンパク質に関して、活性及び機能解析を行なう予定である。

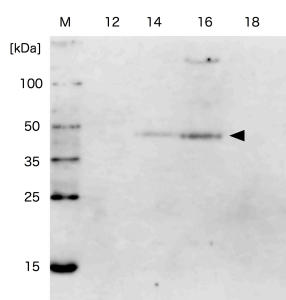


図4 選抜遺伝子由来タンパク質の Western blot 解析

一次抗体：抗 c-myc 抗体  
二次抗体：抗マウス IgG 抗体

グルコースを起点とするゲンチオオリゴ糖合成経路を明らかにするため、<sup>13</sup>C 標識されたグルコース (13C-Glc) を用いたトレーサー実験を行なった。リンドウ培養細胞に終濃度 2% のグルコース (12C-Glc) または 13C-Glc を処理し、経時的にメタボローム解析を行なった。それぞれを比較し、分子量がシフトしたのに関して詳細な解析を行なったところ、UDP グルコースやグルコース 6 リン酸を含む糖関連代謝物が検出された。また、数種類の未知代謝物も検出されたが、MS/MS 解析の結果から糖類が結合した代謝物であることが明らかとなった。これら代謝物の蓄積は Gen2 の合成と相関が見られたことから、ゲンチオオリゴ糖合成に関与する可能性が見出された。

本課題の成果から、相転換遺伝子がリンドウ越冬芽の休眠調節に関与することが明らかとなった。本課題では本相転換遺伝子と Gen2 の直接的な制御機構は証明できなかったが、遺伝子発現と Gen2 の蓄積パターンは酷似しており、これらが相互作用して休眠が調節されている可能性が見出された。また、cDNA library を用いた Gen2 関連酵素の単離から、新規遺伝子が見出された。本遺伝子については融合タンパク質の精製まで終了しており、今後機能解析を行なう予定である。さらにトレーサー実験からゲンチオオリゴ

糖合成に関わることが予想される候補代謝物が見出されており、これらを詳細に解析することでゲンチオオリゴ糖の制御機構の一端が解明されることが期待できる。

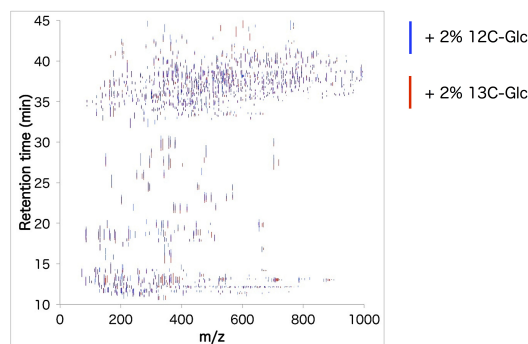


図5 トレーサー解析

## 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2件)

Takahashi H, Imamura T, Konno N, Takeda T, Fujita K, Konishi T, Nishihara M, and Uchimiya H. (2014). The gentio-oligosaccharide gentiobiose functions in the modulation of bud dormancy in the herbaceous perennial *Gentiana*. *Plant Cell*. 26, 3949-3963.

Imamura T, Higuchi A, Sekine KT, Yamashita T, and Takahashi H. (2014). High concentrations of sucrose induce overwintering bud formation in gentian plantlets cultured *in vitro*. *Plant Biotech*. 31, 97-104.

[学会発表](計4件)

高橋秀行・今村智弘・金野尚武・樋口敦美・竹田匠、リンドウ越冬芽の休眠制御機構の探索、第55回日本植物生理学会年会、北海道大学

高橋秀行・今村智弘・金野尚武・竹田匠、メタボローム解析による多年生花卉リンドウの休眠制御物質の探索、第32回日本植物細胞分子生物学会、いわて県民情報交流センター

高橋秀行・今村智弘・金野尚武・竹田匠、リンドウ越冬芽のオリゴ糖を介した休眠調節機構の探索、日本応用糖質科学会平成26年度大会、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター

高橋秀行・今村智弘・金野尚武・藤田晃平・竹田匠、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、東京

農業大学

〔図書〕(計1件)

Nishihara M, Mishiba K, Imamura T, **Takahashi H**, and Nakatsuka T. Molecular breeding of Japanese gentians - Applications of genetic transformation, metabolome analyses, and genetic markers. The Gentianaceae : Volume 2 - *Biotechnology and Applications*, Springer (*in press*).

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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

なし

(3) 連携研究者

なし