

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450039

研究課題名(和文) 果実の糖蓄積および糖酸バランス調節における糖新生・PEPCKの機能解明

研究課題名(英文) Functions of PEPCK and gluconeogenesis in regulation of sugar /acid balance and sugar accumulation in tomato fruit

研究代表者

松倉 千昭 (MATSUKURA, Chiaki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：60361309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PEPCKは糖新生の初発段階の律速酵素であるが、液果型果実の代謝における機能は明らかになっていない。本研究はトマトを用いて同酵素遺伝子を過剰発現/発現抑制した形質転換体を作成し、果実糖度・糖酸バランス調節、植物体生長への影響を調査した。その結果、果実の糖、リンゴ酸含量はPEPCKの発現に応じて増減が見られ、これらの成分調節にPEPCKおよび糖新生が関与していることが明らかとなった。またPEPCK発現レベルは実生生長にも影響し、特に過剰発現形質転換体では糖の添加に伴い顕著な生長促進効果が見られた。このことからPEPCKは実生発達における糖エネルギー利用にも関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：PEPCK is known as a key regulatory enzyme in the gluconeogenesis pathway in plants. However, its physiological function in whole plant development including fruit sugar accumulation is not fully understood in plants with fresh berry-type fruit. To elucidate this function, we generated transgenic tomato plants in which PEPCK is over-expressed or down-regulated. Detailed characterization of the transgenic lines, it was revealed that PEPCK and gluconeogenesis are involved in the regulation of sugar/acid balance in developing tomato fruit. Additionally, PEPCK expression level also affected initial seedling growth. In the PEPCK-overexpressing lines, exogenous sucrose supply strongly promoted post-germination growth. Those results indicate PEPCK is involved in not only regulation in carbohydrate supply but also its availability in tomato seedling.

研究分野：蔬菜生理学、遺伝育種学、糖・アミノ酸代謝

キーワード：PEPCK トマト 果実成分 糖新生 糖蓄積 実生生長 糖酸比

1. 研究開始当初の背景

糖新生は有機酸や脂肪酸から糖を合成する代謝経路であり、動物では糖飢餓条件下においてエネルギー供給を担うことが知られている。ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) はオキサロ酢酸からホスホエノールピルビン酸 (PEP) への合成を触媒し、糖新生の初発反応を制御する酵素である。PEPCK は脂肪性種子の実生生長過程で活性化することが知られているが、それ以外の組織・生長過程における生理機能は長年不明であった。しかし、近年、英国 Sheffield 大を中心とした研究グループや申請者自身により、オウトウ、イチゴ、ブルーベリー、トマトなどの液果型果実において成熟過程で PEPCK が高発現するという報告がなされている。上記の結果は、PEPCK すなわち糖新生の活性化が液果型果実の成熟過程に共通する現象であり、果実の糖蓄積および糖酸バランス調節に有機酸を基質とした糖新生経路が関与していることを強く示唆している。しかし、これら先行研究は PEPCK の発現パターンのみを根拠とした、いわゆる correlation work であり、PEPCK の機能獲得/喪失実験を通じた実証試験は依然として実施されていない。申請者は遺伝子組み換えが容易なトマトで PEPCK 遺伝子の過剰発現/発現抑制形質転換体を作成し、それらの果実における糖・有機酸の代謝動態を解析することで、果実糖度、糖酸バランス調節における糖新生・PEPCK の役割が解明できると考え、本申請課題を実施した。

2. 研究の目的

糖・有機酸は液果型果実において食味や消費者嗜好性を左右する主要成分であり、両者のバランス (糖酸比) は栽培・貯蔵条件や遺伝的背景により大きく変動することが知られている。これらは各代謝系が相互作用した結果と考えられるが、その分子メカニズムについては殆ど解明されていない。

PEPCK はオキサロ酢酸をホスホエノールピルビン酸に変換し、糖新生の初発過程を律速する酵素である。先行研究により、同酵素遺伝子は液果型果実成熟期に非常に高発現することをすることが報告されているが、PEPCK が植物生長や果実発達過程でどのような役割を担っているのかについては依然として不明な点が多い。本研究では液果型果実研究のモデル植物であるトマトを材料に、PEPCK 遺伝子を過剰発現 / 発現抑制した形質転換体トマトを作成し、その特性解析を通して果実糖度・糖酸バランス調節における糖新生および PEPCK の役割を明らかにすることを目的とした。

具体的には、1) トマト果実の糖含量・糖酸バランス調節における PEPCK および糖新生の機能解明、2) トマトにおける新規 PEPCK 遺伝子の発現特性・機能解析、3) 液

果型果実における PEPCK の活性比較および糖度・糖酸比バランス調節への貢献度の解明を行い、液果型果実全般における糖新生・PEPCK の機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まずトマトにおいて既に単離されている PEPCK 遺伝子 (SIPEPCK, Bahrami et al., 2001, PMB, 47: 499-506) に注目し、恒常的発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターと果実成熟期特異的 E8 プロモーターを用いて、当該遺伝子の発現を抑制した RNAi 形質転換ならびに過剰発現形質転換体トマト系統を作成した。これらの系統群について、T₁、T₂ 世代で遺伝子発現解析を行い、狙い通り PEPCK の発現が抑制/上昇している系統を選抜し、導入遺伝子が 1 コピーのホモ接合体系統を複数系統獲得した。これらの材料を活用して T₃、T₄ 世代で果実成分 (糖、有機酸) および植物体表現形質を詳細に解析し、トマトの生長や果実成分調節における PEPCK の生理機能の解明を試みた。また、形質転換系統を用いて発芽実生の特性解析を行い、発芽過程における PEPCK の機能解析を行った。果実、実生における遺伝子発現量と糖、有機酸含量、実生生長の相関を確認することにより、それら器官における PEPCK の機能と糖新生の貢献度を解明した。

多くの高等植物種において PEPCK は 2~4 遺伝子からなる多重遺伝子であることが判っているが、トマトではこれまで一遺伝子しか報告されていない。しかし、申請者は本研究課題開始時に、トマトのゲノム解析を通して新規の SIPEPCK 様遺伝子が存在することを把握していた。本申請課題では当該 SIPEPCK 様遺伝子の全長 cDNA を単離し、これらの発現特性を明らかにすることによってトマトにおける PEPCK の機能多様性を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

最初に、研究代表者の先行研究で当該課題開始前に作成されていた トマト PEPCK 遺伝子 SIPEPCK の RNAi 発現抑制形質転換体のエリート系統選抜と特性解析を行った。まず、導入遺伝子が 1 コピーの T₁、T₂ 世代において発現解析を行い、標的遺伝子の発現レベルが非形質転換体の 20% 以下に抑制されている系統を、CaMV 35S プロモーター連結型で 3 系統、E8 プロモーター連結型で 2 系統選抜した。これらの系統について、T₃、T₄ 世代ホモ系統を用いて、PEPCK 酵素活性を測定したところ、形質転換体では非形質転換体と比較して酵素活性が 17~50% に抑制されていることが確認された。これらの果実について、成熟過程における果実成分 (糖、有機酸) の評価を行った。その結果、形質転換赤熟果実では非形質転換体と比較

して、CaMV 35S プロモーター連結型で 46~59%、E8 プロモーター連結型で 8~16%、可用性総糖含量が減少していることが明らかとなった。また、有機酸含量については、果実における主要有機酸の一つであるリンゴ酸含量が CaMV 35S プロモーター連結型で 24~58%、E8 プロモーター連結型で 32~129% 上昇することが明らかとなった。他方、クエン酸含量については明確な傾向は見られなかった。

続いて栄養成長への PEPCK の効果を検証するため、形質転換体系統の表現形質（実生・栄養生長、果実収量等）の評価を行った。その結果、CaMV 35S プロモーター連結型では非形質転換体と比較して、地上部（植物体高）が 23-30%、根長が 58%-59%減少し、根部において非常に顕著な伸長抑制効果が観察された。地上部については生長が進むにしたがって生長抑制が解除され、播種後 60 日目には、非形質転換体との差は、ほぼ解消された。E8 プロモーター連結型では実生段階では差は見られなかったものの、開花後の栄養成長に変化が見られ、特に果実成熟期以降は非形質転換体との比較で 13%-17%の生長抑制が見られた。他方、果実重量については顕著な差は見られなかった。本実験により、成熟果実の糖蓄積・糖酸比バランス調節に糖新生が介在し、それらの制御に PEPCK が関与していることが証明された。また、PEPCK がトマトの発芽後の実生生長に重要な役割を果たしていることが示された。

これらの解析と並行して、トマトゲノムデータベース (Sol genome network, SGN; <http://solgenomics.net/>) を活用し、トマトにおける他の *SIPEPCK* 遺伝子ファミリーの探索を行った。その結果、推定アミノ酸レベルで 86%と、*SIPEPCK* に非常に相同性の高い *SIPEPCK* 様配列が一つ同定された。しかし、果実および葉において発現解析を行った結果、当該 *SIPEPCK* 様配列は *SIPEPCK* の 1/1000 程度の転写活性しか示さず、偽遺伝子である可能性が高いと考えられた。本研究で作出した RNAi 形質転換体において、顕著な酵素活性の低下が認められたことから、*SIPEPCK* はトマトで機能している唯一の *PEPCK* 遺伝子と考えられる。

続いて、*PEPCK* 過剰発現の効果を検証するため、*SIPEPCK* 遺伝子 cDNA 全長を CaMV 35S プロモーターもしくは E8 プロモーターに連結した形質転換ベクターを作製し、アグロバクテリウム法によりトマトへ形質転換を行った。得られた形質転換系統より導入遺伝子が 1 コピー・ホモ接合体で *PEPCK* 発現が 3 倍以上のエリート系統を CaMV 35S プロモーター連結型で 4 系統、E8 プロモーター連結型で 5 系統獲得した。これらの系統について、T₃、T₄ 世代の赤熟果実における *PEPCK* 酵素活性を評価した結果、CaMV 35S プロモーター連結型で 6-12 倍、E8 プロモーター連結型で 4-8 倍の活性上昇

が確認された。赤熟果実において果実成分（糖、有機酸）測定したところ、非形質転換体と比較して、可溶性総糖含量が CaMV 35S プロモーター連結型で 16~37%、E8 プロモーター連結型で 9~59% 増加することが確認された。他方、有機酸についてはリンゴ酸含量が CaMV 35S プロモーター連結型で 14~44%、E8 プロモーター連結型で 16~41% 減少していた。クエン酸含量については一部の系統で減少していたものの明確な傾向は見られなかった。続いて、表現形質解析（実生生長、栄養生長、果実収量等）の評価を行った。CaMV 35S プロモーター連結型において実生生長を評価したところ、発芽後 10 日目において根伸長が、非形質転換体と比較して、1.77~2.51 倍促進されていた。これらの結果は *PEPCK* 発現抑制形質転換体で得られている結果と相反する効果である。このことから、果実の糖・有機酸蓄積や実生生長の制御に *PEPCK* が遺伝子発現レベルで直接関与していることが証明された。興味深いことに、過剰発現形質転換体の実生の地上部生長において、通常栽培条件では非形質転換体と形質転換体の間で顕著な差が見られなかったにも拘わらず、1.5%、3%のショ糖処理によって形質転換体で強力な生長促進作用が認められた。これらの結果は、*PEPCK* の作用機作が器官によって異なり、実生では糖の利用効率に影響を及ぼしていることを示唆している。

本研究によって、*PEPCK* がトマトの果実成熟期における糖・有機酸蓄積や、実生生長制御に重要な役割を果たすことが明らかとなった。液果型果実の糖蓄積に対する *PEPCK* の関与は、従来、遺伝子発現パターン等で間接的に示唆されるに留まっていた。しかし、本研究課題において全身発現制御による機能獲得/喪失解析を行うことにより、*PEPCK* がトマトの果実成分制御、ひいては発芽実生の生長制御に重要な役割を果たしていることが初めて直接的に証明された。また、糖新生が果実成熟期の糖酸比制御に関与していることを証明した。多くの液果型果実において成熟期に *PEPCK* が高発現することが報告されていることから、本研究は、トマトに留まらず、液果型果実の糖、有機酸蓄積制御機構を理解する上で有用な知見を提供するものと考えられる。また、糖、有機酸含量は果実品質を評価する上で最重要形質の一つであることから、本研究で得られた成果は、将来、糖酸比を制御する栽培技術の開発や高付加価値新品種の開発に大きく寄与すると考えられる。

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2件)

Huang Y-X., Y-G. Yin, A. Sanuki, N. Fukuda,

H. Ezura, C. Matsukura: Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) deficiency affects the germination, growth and fruit sugar content in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 96: 417-425, 2015. (査読有)

Huang Y-X., Y. Goto, S. Nonaka, N. Fukuda, H. Ezura, C. Matsukura : Overexpression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (*SIPEPCK*) promotes soluble sugar accumulation in fruit and post-germination growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Plant Biotechnology*, 32: 281-289, 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

黄永興, 尹永根, 福田直也, 江面浩, 松倉千昭: Functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in tomato plant. 日本植物細胞分子生物学会 2013 年大会・シンポジウム, 北海道大学(北海道札幌市), 2013 年 9 月 11 日.

松倉千昭, 大野友輔, 佐藤未来, 黄永興, 後藤幸久, 福田直也, 江面浩: トマト ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子 RNAi 形質転換体の塩ストレス応答. 園芸学会平成 25 年度秋季大会, 岩手大学(岩手県盛岡市), 2013 年 9 月 21 日.

大野友輔, 佐藤未来, 黄永興, 後藤幸久, 高山真理子, 江面浩, 松倉千昭: トマト AGPase, PEPCK, GAD RNAi 形質転換体の塩ストレス応答. 園芸学会平成 26 年度春季大会, 筑波大学(茨城県つくば市), 2014 年 3 月 30 日.

〔図書〕(計2件)

Saito, T., C. Matsukura: Chapter 1: Effect of salt stress on the growth and fruit quality of tomato Plants, Part I, Stress physiology and molecular biology in horticultural plants, Ed., Kanayama, Y., Kochetov, A., *Abiotic Stress Biology in Horticultural Plants*, Springer Japan, Tokyo, pp. 3-16, 2015.

Matsukura, C.: Chapter 9. Sugar accumulation in tomato fruit and its modification by molecular breeding techniques. Ed., Ezura H., T., Ariizumi, J., Garcia-Mas, J., Rose, *Functional Genomics and Biotechnology in Solanaceae and Cucurbitaceae Crops*, Springer., NewYork, pp. 141-154, 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
研究室 HP
http://www.agbi.tsukuba.ac.jp/~sosaikaki_grc/index.html
筑波大学研究者総覧 (TRIOS)
<http://www.trios.tsukuba.ac.jp/researcher/0000001292>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松倉 千昭 (MATSUKURA, Chiaki)
筑波大学・生命環境系・教授
研究者番号: 60361309

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし