

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07586

研究課題名(和文) 果実細胞壁・果皮クチクラ生合成経路の解明-果実内デンプン分解産物のダイナミズム

研究課題名(英文) Elucidation of biosynthetic pathway of cell wall and cuticle in developing fruit - Dynamism of starch degradation products 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：トマトの緑熟期果実に蓄積したデンプンの代謝経路およびその利用形態を解明するため、デンプン蓄積抑制形質転換体を供試して果実成分、細胞壁および組織強度に注目して解析を行った。その結果、デンプンは果実成熟期間中、可溶性糖だけでなくペクチンの主成分であるUDP-D-ガラクトuron酸に代謝されていることが示された。また、デンプン蓄積が抑制された形質転換系統において赤熟期の果実硬度が減少し、果皮クチクラの量が減少していることが明らかとなった。これらの結果より、デンプン分解産物が赤熟果実において細胞壁などの構成多糖や果皮クチクラの生合成に利用されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デンプンはそれ自体食味を持たないため、従来の果実生理学研究では殆ど注目されておらず、漠然と、成熟期に可溶性糖に代謝される、と説明されてきた。本研究ではデンプン蓄積欠損遺伝子組換えトマトを用いて、果実におけるデンプンの代謝的役割を解析し、デンプン分解産物が成熟中に可溶性糖だけでなくペクチンやクチクラ生合成に関与し、果実硬度にも影響するという結果を得た。デンプンから細胞壁生合成やクチクラに向かう代謝経路はこれまで報告されておらず、果実生理学分野では大きな学術的意義を持つと考えられる。また、食感、果実硬度など商業的価値を持つ形質のメカニズム解明にも資することから相応の社会的意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to elucidate the physiological roles of starch accumulated in tomato fruit. In order to understand the metabolic pathway of starch and its utilization during fruit ripening, the starch-defect transgenic lines in which the expression of ADP-glucose pyrophosphorylase was suppressed were analyzed in aspects of the cell wall polysaccharides, fruit cuticle and fruit firmness. Results showed that starch is metabolized to UDP-D-galacturonic acid which is a major component of cell wall pectin as well as soluble sugars. In addition, it was revealed that in the starch-defect lines, the firmness of red-ripe fruit and amount of cuticle decreased. All taken together, the present research demonstrated that starch degradation products are utilized not only for soluble sugars but also biosynthesis of cell wall polysaccharides and fruit cuticle, then affect fruit firmness in red-ripe fruit.

研究分野：園芸生理学、遺伝育種学、糖・アミノ酸・有機酸代謝、環境ストレス応答

キーワード：果実 トマト デンプン AGPase 糖 ペクチン ガラクトuron酸 クチクラ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

著者は、トマト果実におけるデンプン蓄積が果実糖度に影響を与えるメカニズムに注目して研究を進め、これまでに 1) 赤熟果実の糖蓄積促進には未熟～緑熟期のデンプン蓄積が重要であること、2) デンプン生合成律速酵素 ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) 遺伝子ファミリーの中で特に *AgpS1*、*AgpL1* 遺伝子がデンプン蓄積に関与し、各々異なる発現制御を受けることを明らかにしてきた。また、*AgpS1*、*AgpL1* 遺伝子の発現を抑制したデンプン欠損形質転換体をトマトで初めて作出し、予備的試験において赤熟果実における糖含量の 20-30% が緑熟期に蓄積したデンプン由来であること、デンプン欠損形質転換果実のヘミセルロース含量が減少すること、果皮クチクラ層が薄くなることなどを見出した。デンプンはそれ自体が食味に貢献しないことから、果菜類では注目度が高いとは言えず、現在、トマトで研究を行っているグループは著者以外にドイツ、イスラエルに各 1 グループ存在するのみである。これらの研究グループも主に糖・有機酸などとの関連性に注目して研究を進めており、細胞壁や果皮クチクラ形成に注目しているのは申請者のみである。他方、果皮クチクラ生合成については、食感、日持ち性、果実硬度に影響することから、米国コーネル大学等、幾つかのグループが研究に取り組んでいる。しかし、デンプン蓄積と関連付けて研究を行っているグループはおらず、また、他の果菜類、液果型果樹においてもこのような研究事例は報告されていない。このことから、申請者は、AGPase 発現改変形質転換体の解析を通してデンプンが果実細胞壁、果皮クチクラ層形成に関与する可能性を検証し、更には、果実細胞壁、果皮クチクラ層の代謝経路を解明できると考え本研究を実施した。

2. 研究の目的

著者らは果実内デンプン蓄積制御様式に注目し、トマト果実における糖蓄積促進メカニズムの解明を行ってきた。その過程において、デンプン生合成の鍵酵素の一つである ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) 遺伝子 *AgpL1*、*AgpS1* 遺伝子の発現を抑制した RNAi 形質転換体を作成し、それらの系統において赤熟果実糖含量の減少、植物体の生長遅延等が生じること、デンプン蓄積が顕著に抑制された 35S::*AgpS1*^{RNAi}-67 系統を用いた予備試験において、果実のヘミセルロース含量が減少すること、果皮クチクラ層が薄くなることなどを見出した。これらの結果は緑熟果実に蓄積したデンプンが赤熟期に糖だけでなく細胞壁などの構成多糖に代謝される可能性を示唆している。しかし、デンプンはそれ自体が食味に貢献しないことから、液果型果実では解析事例が少なく、デンプンが成熟過程でどのような経路で分解され、どのように利用されているのかは不明である。そこで、本研究では先行研究で作出したデンプン欠損 (*AgpS1* および *AgpL1* RNAi) 形質転換系統を用い、果実におけるデンプンの生理機能を解明することを目的とした。具体的には (1) 果実における糖リン酸、細胞壁構成多糖の動態変化、(2) 果皮クチクラ含量、(3) 果実硬度について解析を行い、デンプン欠損が果実形質に及ぼす影響を検証した。また、デンプン欠損が植物体へ与える影響についても、植物体の生育、組織強度の観点から評価を行った。

3. 研究の方法

本研究では、先行研究で作出した恒常的全身発現プロモーター・カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターもしくは緑熟期果実特異的 *Ppc* (phosphoenolpyruvate carboxylase) 2 プロモーターを連結して *AgpS1* または *AgpL1* の発現を抑制した RNAi 形質転換体 *Ppc2*::*AgpS1*^{RNAi}-36、35S::*AgpS1*^{RNAi}-67、35S::*AgpL1*^{RNAi}-2、35S::*AgpL1*^{RNAi}-3 を供試した。これらの系統群については、T₁、T₂ 世代でサザン解析および遺伝子発現解析を行い、*AgpS1* もしくは *AgpL1* 遺伝子の発現が抑制されており、導入遺伝子が 1 コピーのホモ接合体系統であることを確認済である。これらの材料を活用して後代系統において、AGPase 活性、果実成分 (デンプン、糖、糖リン酸、有機酸、細胞壁構成多糖) 果実形質 (果実硬度、クチクラ厚) および植物体形質 (草丈、茎の物理特性) を詳細に解析し、トマトの植物体生長、果実成分調節、果実発達における AGPase、デンプンの生理機能の解明を行った。

また、上記解析と並行して、新たに *AgpS1*、*AgpL1* 遺伝子を 35S プロモーターで各々過剰発現させた形質転換トマト系統の作出を行った。T₀、T₁ 世代でサザン解析により導入遺伝子が 1 コピーのホモ接合体系統を複数系統獲得し、これらの果実における遺伝子発現、デンプン含量、果実糖含量の測定を行った。

4. 研究成果

(1) AGPase RNAi 発現抑制形質転換体の特性解析

果実デンプン含量を測定した結果、供試した全ての AGPase RNAi 形質転換系統で緑熟果実 (開花後 26 日目: DAF 26) において、非形質転換系統 (WT) と比較して 7.2-34% のレベルに抑制されていることが確認された。形質転換系統果実の AGPase 酵素活性を測定した結果、デンプン含量と概ね一致した傾向を示し、供試系統において確かにデンプン生合成が抑制されていることを確認した。特に 35S::*AgpS1*^{RNAi}-67 については 4 系統の中で最も顕著にデンプン蓄積が抑制されており、全ての果実発達ステージにおいて殆どデンプン蓄積は認められなかった。また、非形質転換系統における果実組織切片のヨウ素デンプン染色により、デンプンは外果皮、中果皮への局在はほぼ見られず、内果皮および胎座増生部組織に局在することが明らかとなっ

た。この結果はデンプンが内果皮、中心柱、隔壁、胎座を中心に局在し、外果皮、ゼリー、種子では低含量であることを示した報告 (Schaffer *et al.*, 1997) と一致した。一方で、播種後 40 日目の主茎におけるヨウ素デンプン染色より、主茎にはほぼデンプンが蓄積しないことが確認された。

AGPase RNAi 形質転換体 4 系統の果実糖度を測定したところ、可溶性糖含量の平均減少率は 31% であった。この結果は、未熟-緑熟果実に蓄積したデンプンの赤熟期果実糖含量への寄与率を反映していると考えられる。また、緑熟果実 (DAF 26)、赤熟果実 (DAF 42) におけるリンゴ酸含量については 35S::AgpS1^{RNAi}-67 の緑熟果実 (DAF 26) において WT と比較して約 1.4 倍、赤熟果実 (DAF 42) では約 1.7 倍増加し、Ppc2::AgpS1^{RNAi}-36 では赤熟果実 (DAF 42) において約 1.4 倍増加していた。一方、35S::AgpL1^{RNAi}-2 および 35S::AgpL1^{RNAi}-3 においては有意な差は確認されなかった。リンゴ酸とデンプンの代謝はトレードオフの関係にあることが報告されており (Centeno *et al.*, 2011)、本研究の結果はデンプン合成の低下をリンゴ酸が補った結果であると考えられる。但し、他の形質転換体 2 系統では共通する結果が得られなかったことから、デンプン合成の低下を緩衝する要因として有機酸以外の代謝系が関与している可能性も排除できないと考えられる。また、クエン酸含量もリンゴ酸含量の増加と同様に、35S::AgpS1^{RNAi}-67、Ppc2::AgpS1^{RNAi}-36 において限定的に増加しており、デンプン合成の抑制に伴いリンゴ酸だけでなく有機酸代謝経路全体が活性化されている可能性が示唆された。

播種後 40 日、50 日、70 日目における草丈の測定結果から、恒常的全身発現を誘導する CaMV 35S プロモーターを使用した 35S::AgpS1^{RNAi}-67 および 35S::AgpL1^{RNAi}-2 において生長抑制が観察された。これらの系統はデンプン蓄積が顕著に抑制されていることが確認されている。他方、果実特異的 Ppc2 プロモーターを使用した Ppc2::AgpS1^{RNAi}-36 や、CaMV 35S プロモーターを使用しているもののデンプン蓄積抑制が限定的な 35S::AgpL1^{RNAi}-3 については、播種後 70 日目で草丈の抑制は見られなかった。AGPase^{RNAi} 系統における生長抑制は著者らの先行研究においても報告されている。本研究においてプロモーターの特性やデンプン蓄積レベルの違いに対応した生長抑制が確認されたため、これらの影響は AGPase 遺伝子の発現抑制に起因することが確認された。先行研究では 35S::AgpS1^{RNAi}-67 のソース葉において光合成活性が低下することが明らかになっており、35S::AGPase^{RNAi} 系統において光合成産物の供給量の低下がこれらの生長抑制を引き起こしている可能性が高い。

細胞壁構成多糖の成分分析より、AGPase^{RNAi} 形質転換体 4 系統では赤熟果実外果皮の Na₂CO₃ 可溶性画分におけるホモガラクトuron酸含量が WT と比べ 25-75% 減少していることが明らかとなった。Na₂CO₃ 可溶性画分には主としてペクチンが含まれており、ペクチンの中でも特にガラクトuron酸が直鎖状に結合しているホモガラクトuron酸が豊富であることが明らかにされている。ホモガラクトuron酸は特に一次細胞壁間に豊富に存在し、細胞接着に関わることが知られている。一方、細胞壁多糖の主成分の一つであるセルロースについては、デンプン欠損形質転換系統と WT の間で含量に大きな差は見られなかった。レオメーターで果実硬度を測定した結果、AGPase^{RNAi} 形質転換体 4 系統において赤熟期における果実硬度の低下が観察された。上記の結果を考察すると、これらの果実硬度減少はセルロースではなくペクチンの含量変化により引き起こされたものである可能性が高いと考えられる。

また、スダン 4 染色によりクチクラを染色し、果皮クチクラ厚の測定を行った。その結果、供試した全ての RNAi 形質転換系統において、WT と比較して、全果実ステージ (18、26、34、42 DAF) で果皮クチクラ厚が最大 50% 程度減少していることが確認された。

デンプン欠損の影響を遺伝子発現レベルで解析するため、最も顕著にデンプン蓄積が抑制されている 35S::AgpS1^{RNAi}-67 と WT の果実 (14、26、34、42 DAF) を供試して RNA-sequence 解析 (RNA-Seq) を行った。その結果、形質転換体果実において果実の軟化や脂肪酸輸送・代謝に関係する幾つかの蛋白質、輸送体、酵素遺伝子の発現が大きく変動していることが明らかとなった。これらの結果は、デンプン蓄積抑制による分解産物の減少が、転写レベルで細胞壁構成多糖や果皮クチクラの代謝に影響を及ぼした結果と考えられる。

本研究の結果、緑熟果実に蓄積したデンプンの分解産物は、これまで考えられてきた可溶性糖だけでなく、細胞壁構成多糖の生合成にも利用されていることが明らかとなった。デンプン代謝経路がペクチンやクチン生合成に関与しているという報告はこれまでなされていない。本研究が初めて明らかにした知見であり、果実における細胞壁構成多糖や果皮の代謝制御を理解する上で、学術的に大きな意義を有するものと考えられる。(現在、論文準備中)

(2) AGPase 過剰発現形質転換体の特性解析

本研究では、デンプンの過剰蓄積の効果を検証するため、(1)の解析と並行して AgpS1、AgpL1 遺伝子の過剰発現形質転換体系統を作成し、その特性解析を行った。T₀、T₁ 世代でサザン解析により導入遺伝子が 1 コピーのホモ接合体系統を複数系統獲得し、標的遺伝子の発現が上昇している系統を選抜した。しかし、選抜された系統について T₂、T₃ 世代を供試して果実のデンプン含量、可溶性糖含量を測定した結果、安定してデンプンが高蓄積している系統を得ることができなかった。また、AgpS1、AgpL1 過剰発現形質転換体系統の交配系統を作成し、デンプン蓄積の評価を行ったが、優良系統の獲得は出来なかった。これらの結果は、トマト果実においてデンプンの過剰蓄積を抑える何らかの機構が存在することを示唆している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

(1) Diverse functions of starch decomposition products in developing fruit of tomato
Matsukura C, Yu X-R, Yin Y-G, Ezura H.

第60回日本植物生理学会年会, 2019年3月13日(名古屋).

(2) トマトにおいて AGPase と PEPCK の発現抑制は果実糖含量を減少させる

松倉千昭, 鈴木春香, 黄永興, 尹永根, Gibon Y, 岩井宏暁, 江面浩

日本植物細胞分子生物学会第36回大会, 2018年8月27日(金沢).

(3) Suppression of ADP-glucose pyrophosphorylase affects cell-wall composition as well as fruit sugar and sugar phosphate contents in tomato fruit

Matsukura C, Suzuki H, Miyachi M, Gibon Y, Rothan C, Iwai H, Ezura H.

第59回日本植物生理学会年会, 2018年3月28日(札幌).

(4) トマト ADP-glucose pyrophosphorylase 発現抑制が果実の細胞壁多糖構成に及ぼす影響

松倉千昭, 鈴木春香, 宮地桃子, Gibon Y, Rothan C, 野中聡子, 福田直也, 岩井宏暁, 江面浩.

日本育種学会第132回講演会, 2017年10月8日(盛岡).

(5) トマト ADP-glucose pyrophosphorylase 遺伝子の発現抑制が組織強度, 細胞壁多糖構成に及ぼす影響

鈴木春香, 宮地桃子, Gibon Y, Rothan C, 野中聡子, 福田直也, 岩井宏暁, 江面浩, 松倉千昭.

園芸学会平成28年度秋季大会, 2016年9月11日(名古屋).

(6) トマトにおける *AgpL1* および *AgpS1* 遺伝子の過剰発現に伴う果実形質への影響

門脇颯斗, 後藤幸久, 野中聡子, 福田直也, 江面浩, 松倉千昭.

園芸学会平成28年度秋季大会, 2016年9月11日(名古屋).

〔図書〕(計0件)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP

<http://matsukura-labo.sakura.ne.jp/>

筑波大学研究者総覧 (TRIOS)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。