

低温処理によるテンサイ子葉への可溶性糖の蓄積

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松平, 洋明, 吉田, みどり, 佐藤, 裕 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001375

低温処理によるテンサイ子葉への可溶性糖の蓄積

松平洋明・吉田みどり・佐藤裕

I. 緒 言

テンサイ (*Beta vulgaris* L.) は、ヨーロッパを中心に、北米、ロシアならびに北海道等で広く栽培されており、全世界で生産される砂糖原料の約3割を占めている(農畜産業振興機構『需給関係資料』)。我が国においても近年では国産糖の8割以上がテンサイを原料に製造される(てん菜糖業年鑑, 2011)。我が国におけるテンサイの栽培は北海道の畑作地帯において輪作体系に組み込まれて行われており、地域には製糖業界をはじめ関連する産業も多く、極めて重要な作物となっている。

北海道でのテンサイ栽培は現在のところ9割以上が移植栽培である(てん菜糖業年鑑, 2011)。1~2ヶ月施設内で育苗することにより、十分な初期生育量を確保できることから、北海道のテンサイ収量の増加と安定化に大きく貢献している。しかしながら、今後想定される輸入テンサイ糖との競争を考えれば、低コスト化に大きく寄与できる直播栽培が不可欠である。

北海道において直播栽培を困難にしている問題点の一つとして、播種後の晩霜害があげられる。テンサイの主産地では、播種後の子葉が展開した直後の4月下旬から5月上旬にかけての時期に夜間に氷点下となることが少なからぬ頻度で起こり、霜が降りることによって幼苗が凍結・枯死してしまうため、播き直しが必要となる場合もある(角田・戸田, 2009)。この問題に対する解決策として耐凍性の高い品種の育成が挙げられるが、これまでに耐凍性育種が行われたことはない。テンサイは冬期間に栽培される植物ではないが、開花には春化を要求することから、低温馴化能(氷点以上の低温下にさらされることにより、耐凍性を獲得する能力(THOMASHOW, 1999))をもつことが推察される。しかしながら、テ

ンサイにおいては、耐凍性についてごく僅かな報告があるのみであり(WOOD *et al.*, 1950; WOOD, 1952)、幼苗の低温応答や低温馴化に関して生理学的な知見は得られていない。そこで、テンサイの耐凍性を高める技術を開発するためには幼苗の低温応答に関する基礎的なデータを蓄積する必要があると考えられる。

低温馴化の過程では、遺伝子発現(VOGEL *et al.*, 2005; HANNAH *et al.*, 2005)や代謝(GUY *et al.*, 2008)に大きな変化が生じ、それにもなつて膜構造の変化(UEMURA and STEPONKUS, 1994; UEMURA *et al.*, 1995)や水分含量の低下(KACPERSKA, 1993)、プロリン等のアミノ酸や可溶性糖の増加(ALBERDI and CORCUERA, 1991)といった数多くの変化が引き起こされる。これらは細胞外氷結による物理的傷害の低減や脱水耐性向上に働くとされる。

これらの変化のうち、可溶性糖の蓄積は広範な植物種で確認されており、耐凍性に密接な関係がある(STITT and HURRY, 2002)。多くの場合、凍結保護剤として働くスクロース、フルクトースならびにグルコースなどの可溶性糖が低温にさらされることによって蓄積する。冬コムギや多くのイネ科牧草ではフルクタン(YOSHIDA and TAMURA, 2011)が、シロイヌナズナや耐塩草類である *Distichlis spicata* (Saltgrass)、ならびにアルファルファ等のマメ科牧草は、低温馴化の際にラフィノース、スタキオース等のラフィノース族オリゴ糖が蓄積し、耐凍性に寄与することが知られている(CASTONGUAY *et al.*, 1995; KLOTKE *et al.*, 2004; SHAHBA *et al.*, 2003)。これらのオリゴ糖は浸透圧を調節する適合溶質として、あるいは膜成分の保護などの働きによって耐凍性を高めると考えられている(LIVINGSTON *et al.*, 2009)。また、シロイヌナズナにおいて β -アミラーゼをコードする *BMV7* および *BMV8* 遺伝子、ならびに α -Glucan/Water Dikinase をコードする *SEX1* が低温に応答して働き、デンプンを分解してマル

トースおよびマルトオリゴ糖を蓄積することが知られている(KAPLAN and GUY *et al.*, 2004; YANO *et al.*, 2005)。これらのマルトースおよびマルトオリゴ糖も凍結保護剤としての機能が知られている(CROWE *et al.*, 1990)。

以上のような、植物の低温応答として一般的である可溶性糖の蓄積について、量的な変化や構成成分についてテンサイ幼苗で明らかにすることは、テンサイの低温応答の生理学的な基礎知見となり、これまでに確立されていない幼苗期の低温馴化能を評価するための耐凍性検定法の開発にも寄与すると期待される。そこで本研究では、子葉期のテンサイ幼苗における低温応答について、糖蓄積に注目して解析した。

II. 材料および方法

1. 供試材料

北海道農業研究センターで育成されたテンサイ系統「NK-219mm-O」(以下、「NK-219」と称する)を本研究に用いた。本系統は葉片のカルス化およびカルスからの植物体再性の能力が極めて高いことが知られ、遺伝子導入実験を行う上で利用価値が高い。培養土(サカタスーパーミックス A)に播種後、21℃、16時間日長下で育成した。播種後2週間の子葉が十分に展開し、かつ本葉が出現していない(子葉期)植物体を5℃、10℃、15℃もしくは20℃に設定したグローブチャンバーに移して16時間日長で7日間育成した。

2. 可溶性糖の抽出と分析

上記の温度処理を施した植物体から、処理0日(無処理)、1日、3日、5日ならびに7日後にそれぞれ3個体から子葉を採取し、子葉の約5倍量の超純水を加えて1時間ボイルすることにより可溶性糖を抽出した。可溶性糖抽出物は0.45 μ mのシリンジフィルターで濾過した後、糖分析に用いた。それぞれのサンプルの抽出液には、液体クロマトグラフィーの内部標準物質として、プロピレングリコール(最終濃度1 mg/ml)を添加した。

可溶性糖の含量は、フルクトース、グルコース、二糖およびオリゴ糖についてYOSHIDAら(1998)に基づきShodex KS-802およびKS-803カラム(Shodex, Tokyo, Japan)を連結した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分画し、屈折率検出器で検出す

ることで内部標準および標準物質との比較を行い定量した。より詳細な糖の構成成分については、Carbo Pac PA-1 anion-exchange columnを装着したパルスアンペロメトリック検出器付き高速陰イオン交換クロマトグラフィーDX 500(Dionex, CA, USA)(HPAEC)により同定した。HPAECの分離は150mM NaOH/酢酸ナトリウムグラジエントを流速1 ml/minで用いた。酢酸ナトリウムグラジエントは、0-1min, 25mM; 1-2min, 25-50mM; 2-20min, 50-200mMの通りに行った。スクロースとマルトースの同定にはHPAECを用い、各々の含量は、HPLCで測定した二糖の含量をHPAECで測定したスクロースとマルトースのピーク面積の比で割ることによって求めた。

3. グルコアミラーゼアッセイ

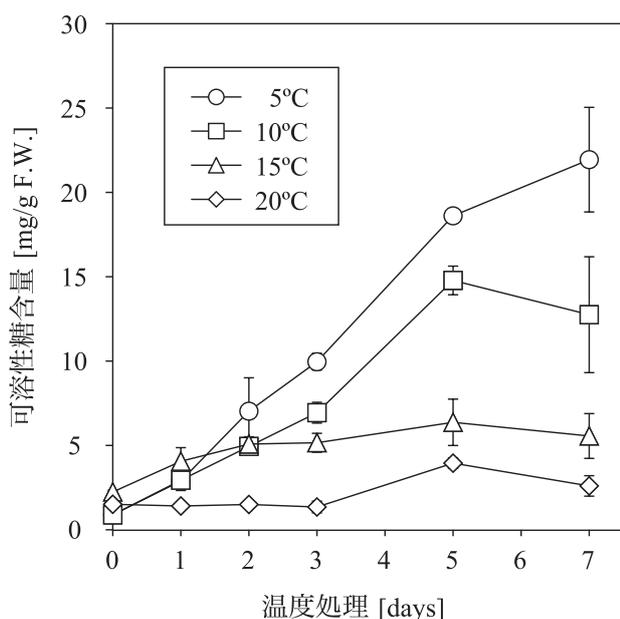
グルコアミラーゼ反応液(100mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)、6 mg/mlグルコアミラーゼ(和光純薬工業))と可溶性糖サンプルを等量ずつ混合し、40℃で15分間反応した。反応物は上記と同様にHPAECで分析した。

III. 結 果

1. テンサイ子葉の温度処理に応じた可溶性糖の蓄積

5～15℃の低温に対するテンサイの応答を、子葉に含まれる糖含量の変化に着目して分析した。低温処理を行う前(0日目)は、子葉に含まれる可溶性糖の含量は、生重量1 gあたり1～2 mgと極めて少ないが、処理温度に応じて総糖含量の変化が見られた(第1図)。5℃処理では、子葉に含まれる可溶性糖は顕著に増加し、7日間の処理により、0.9mg/gF.W.から21.9mg/gF.W.まで増加した。10℃処理では5日目までに0.9mg/gF.W.から14.8mg/gF.W.まで増加したが、その後は顕著な増加は見られなかった。なお、5℃および10℃処理での糖蓄積については反復実験により同様の結果を得ている(データは示さない)。一方、15℃および20℃処理では、可溶性糖の含量はわずかに増加するか、もしくはほとんど変化がみられなかった(第1図)。

15℃および20℃処理では本葉がやや展開する程度の生長が見られたが、5℃および10℃処理では、植物体はほとんど生長しなかった。

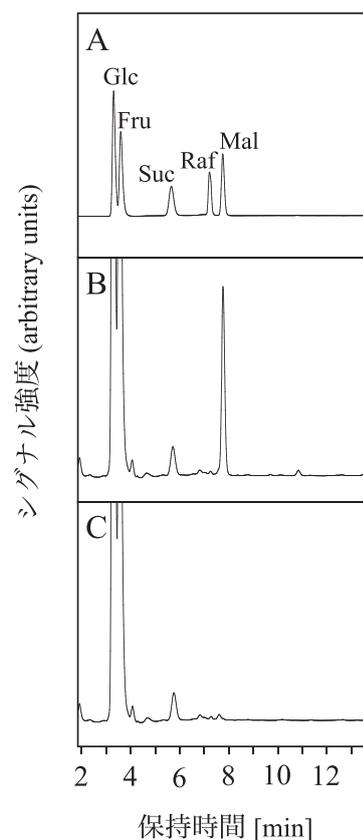


第1図 テンサイ子葉に蓄積する総可溶性糖含量の温度処理による変化

5°C, 10°C, 15°Cもしくは20°Cで1週間処理した幼苗から子葉を採取し、可溶性糖含量をHPLCにより測定した。バーは標準誤差(n=3)を示す。

2. 低温応答で蓄積する糖の同定

低温処理によってテンサイ子葉に蓄積する可溶性糖の構成成分を、HPAECで詳細に調べた。5°C, 5日間処理した子葉サンプルの典型的な結果を第2図に示す。低温処理によって蓄積量が増加する主な可溶性糖は単糖(フルクトースおよびグルコース)であり、残りのほとんどは二糖であった。二糖では、スクロースに対応する5.8min(Retention time)のピークとは別に、7.9minに顕著なピークを検出した(第2図B)。標準物質(第2図A)との比較により、7.9minのピークはマルトースであると推定されるが、低温処理によって植物体にマルトースが蓄積する事例は極めて少ない。そこで、子葉で検出された7.9minのピークがマルトースである確証を得るため、グルコアミラーゼ反応により検証した。グルコアミラーゼはグルコース分子が重合した α -グルカンに存在する α (1-4)および α (1-6)グリコシド結合を加水分解する活性を持ち、デンプンやマルトオリゴ糖をグルコースに加水分解する。グルコアミラーゼ反応の結果、7.9minのピークが消失した。したがって、ここで見出された7.9minのピークはマルトースと同定した。

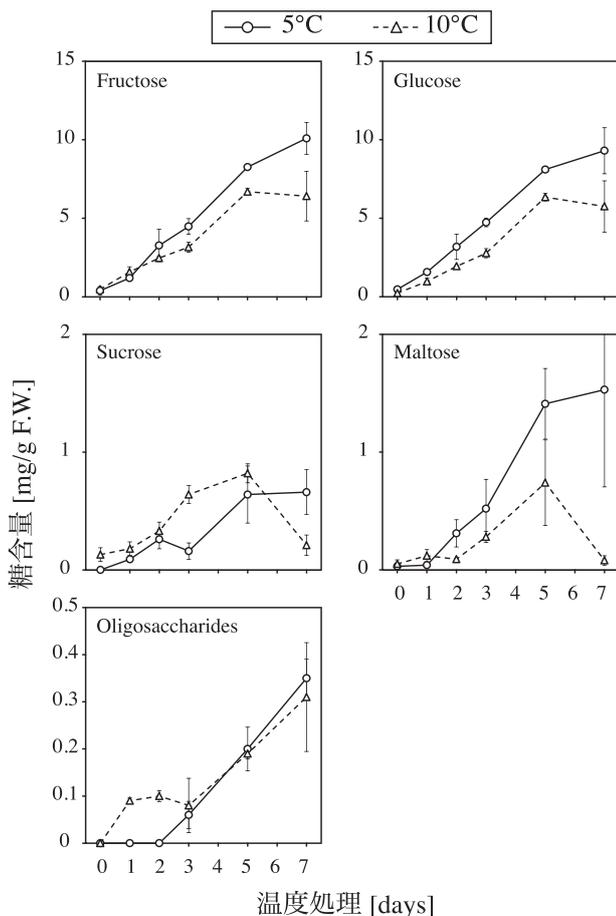


第2図 高速陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) によるテンサイ子葉に蓄積した可溶性糖の分析

(A)標準物質, (B)5°C, 5日間処理した植物体の子葉に含まれる可溶性糖のクロマトグラム, (C)グルコアミラーゼ処理。(B)と同一のサンプルを3mg/mlグルコアミラーゼ, 50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)中で40°C, 15分間反応した。Fru, フルクトース;Glc, グルコース;Suc, スクロース;Raf, ラフィノース;Mal, マルトース。

3. 低温処理による可溶性糖構成成分の変動

5°Cおよび10°C処理により増加する可溶性糖の各構成成分について、処理日数による変化を分析した(第3図)。フルクトースおよびグルコースは5°C処理時間に応じて顕著に増加し、フルクトースで0.4mg/gF.W.から10.1mg/gF.W., グルコースでは0.5mg/gF.W.から9.3mg/gF.W.まで増加した。これらの単糖は子葉に蓄積した可溶性糖の約90%を占める。10°C処理では、グルコースとフルクトース含量の増加は処理後5日目まで認められた。二糖であるマルトースとスクロースも同様に5°C処理で蓄積量が増加したが、マルトース含量がスクロース含量の約2倍であった(第3図)。一方、10°Cでは最初の5日でマルトースとスクロース含量は増加するもの



第3図 低温処理によってテンサイ子葉に蓄積した可溶性糖各構成成分の変化

5°C (○, 直線)および10°C (△, 破線)処理によって子葉に蓄積したフルクトース, グルコース, スクロース, マルトースならびにオリゴ糖の蓄積量の変化を示す。バーは標準誤差(3個体)を示す。

の, 5日目から7日目の間では減少した。オリゴ糖含量は主に2日目以降に増加した。

IV. 考 察

本研究では, 子葉への可溶性糖の蓄積に注目してテンサイ幼苗の低温応答特性を解析した。フルクトース, グルコース, スクロース, マルトースおよびオリゴ糖の蓄積が5°Cと10°Cの双方の処理で見られたのに対し, 15°Cおよび20°Cでは見られなかった(第1図, 第3図)。よって, テンサイの幼苗が低温応答するのは15°Cよりも低い温度であると考えられる。

緒言でも述べたように, 低温馴化能をもつ植物は一般にスクロース, グルコース, フルクトースを蓄

積する。これらのうち, テンサイの子葉は, 低温下では単糖(フルクトースとグルコース)が主に蓄積し, 全体の約9割に達する。ほとんどの植物ではこれらの単糖に加え, 凍結保護剤として働く二糖のスクロースが低温馴化の過程で蓄積する(STITT and HURRY, 2002)。例えば低温馴化したキャベツの幼苗は本葉に含まれるスクロース, グルコースならびにフルクトースの合計が約3 mg/gF.W. から約18 mg/gF.W. まで増加する(SASAKI *et al.*, 1996)。ライムギの低温馴化では総糖含量は10.3mg/gF.W. から24.7mg/gF.W. に増加する(KOSTER and LYNCH, 1992)。また, シロイヌナズナは1°Cでわずか1日間の処理でも低温馴化を示すが, その間に可溶性糖含量は約5 mg/gF.W. から約20mg/gF.W. に増加する(WANNER and JUNTILA, 1999)。耐凍性の向上は可溶性糖の蓄積以外にも多くの要素に関わるために単純な比較は難しいが, 5°C, 7日間の処理でテンサイの子葉に蓄積する可溶性糖含量はこれらの事例とも近い値であり, 耐凍性の向上にある程度寄与していると考えられ, 今後実験的に明らかにする必要がある。

興味深いことに, テンサイの子葉が5°Cの低温に応答する時に優先して蓄積する二糖はスクロースよりも, むしろマルトースであることが明らかとなった(第2図, 第3図)。単糖であるフルクトースおよびグルコースは温度変化に応じてほぼ同様の反応を示すのに対して, 二糖であるスクロースとマルトースを比較した場合, マルトースの方がより低温に反応して蓄積することが示された。蓄積量は単糖よりもはるかに少ないものの, マルトースはトレハロースと同様に凍結保護効果の高い凍結保護剤として働くという報告もあり(CROWE *et al.*, 1990), 低温下でテンサイ子葉に蓄積するマルトースには耐凍性への寄与等, 重要な生理学的機能が推測される。

植物において一般的にマルトースはデンプンの分解によって生じるとされている。低温処理に応答したマルトースおよびマルトオリゴ糖の蓄積は, シロイヌナズナでも既に報告されている(KAPLAN and GUY, 2004, 2005)。β-アミラーゼ(デンプンを分解してマルトースを生じる)をコードする *BM7* および *BM8* 遺伝子は低温ショックに応答して発現量が増加し, それにともなってマルトースの蓄積が見られる(KAPLAN and GUY, 2004)。また, 低温によるマルトースの蓄積にβ-アミラーゼ遺伝子が関与

していることはRNA interferenceによる*BMV8* 遺伝子の発現抑制実験からも裏付けられている(KAPLAN and GUY, 2005)。さらに、低温によって生じる光合成装置への障害の低減に、直接あるいは間接的にマルトースの蓄積が関わることを示唆された(KAPLAN and GUY, 2005)。また、低温馴化の耐凍性が低下する*STARCH EXCESS1 (SEX1)*変異体では、マルトオリゴ糖の蓄積能が損なわれていた(YANO *et al.*, 2005)。これらの報告では、マルトースはデンプンの分解によって生じるとされている。

一方で、植物における単糖からのマルトースの*de novo* (新規)合成は、ハウレンソウの子葉のみでしか報告例がない。SCHILLING(1982)によって2分子の α -D-グルコース-1-リン酸から1分子のマルトースを*de novo*合成するマルトースシンターゼ活性が報告されている。テンサイとハウレンソウがいずれも分類上ヒユ科に属しており両者が比較的近縁であることから、テンサイの子葉においてもマルトースシンターゼが働いている可能性がある。テンサイにおける上述のマルトース代謝経路の低温応答をさらに解析することにより、テンサイの低温馴化機構を明らかにすることができるものと期待される。また、マルトースを始めとする各種可溶性糖の蓄積量と耐凍性との関係を明らかにすることにより、糖類の蓄積量による低温馴化能の評価手法開発に応用可能である。

V. 摘 要

1. テンサイ幼苗の低温応答について生理学的な知見を得るため、低温処理によって子葉に蓄積する可溶性糖を分析した。
2. 10℃、および5℃で子葉では可溶性糖が徐々に蓄積したが、15℃および20℃ではほとんど糖含量に変化が見られなかった。つまり、テンサイは10℃～15℃の間に低温応答を開始する温度があると考えられる。
3. 低温処理によって蓄積する可溶性糖の約9割が単糖(フルクトースおよびグルコース)であり、残りのほとんどは二糖(スクロースおよびマルトース)であった。
4. 低温応答によって主に蓄積する二糖は多くの植物の場合スクロースであるが、テンサイの子葉ではマルトースも蓄積し、特に5℃処理ではマルトースがスクロースよりも顕著に蓄積した。

5. 以上の結果から、テンサイ子葉における低温応答するマルトース代謝はテンサイ幼苗の低温馴化機能に関わる可能性が示唆された。

引用文献

- 1) ALBERDI M. and CORCUERA L.J.(1991) : Cold acclimation in plants. *Phytochemistry*, 30, 3177-3184.
- 2) CASTONGUAY Y., NADEAU P., LECHASSEUR P. and CHOUINARD L.(1995) : Differential Accumulation of Carbohydrates in Alfalfa Cultivars of Contrasting Winterhardiness. *Crop Sci.*, 35, 509-516.
- 3) CROWE J.H., CARPENTER J.F., CROWE L.M. and ANCHORDOGUY T.J.(1990) : Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, 27, 219-231.
- 4) GUY C., KAPLAN F., KOPKA J., SELBIG J. and HINCHA D.K.(2008) : Metabolomics of temperature stress. *Physiol. Plant.*, 132, 220-235.
- 5) HANNAH M.A., HEYER A.G. and HINCHA D.K.(2005) : A Global Survey of Gene Regulation during Cold Acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics*, 1, e26.
- 6) KACPERSKA A.(1993) : Water potential alterations - prerequisite or triggering stimulus for the development of freezing tolerance in overwintering herbaceous plants? In : *Advances in Plant Cold Hardiness* (PH Li and L Christersson, eds), CRC Press, Boca Raton, 73-91.
- 7) KAPLAN F. and GUY C.L.(2004) : β -Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol.*, 135, 1674-1684.
- 8) KAPLAN F. and GUY C.Y.(2005) : RNA interference of *Arabidopsis* beta-amylase 8 prevents maltose accumulation upon cold shock and increases sensitivity of PSII photochemical efficiency to freezing stress. *Plant J.*, 44, 730-743.

- 9) KLOTKE J., KOPKA J., GATZKE N. and HEYER A.G.(2004) : Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant Cell Environ.*, 27, 1395-1404.
- 10) KOSTER K.L., LYNCH D.V.(1992) : Solute Accumulation and Compartmentation during the Cold Acclimation of Puma Rye. *Plant Physiol.*, 98, 108-113.
- 11) LIVINGSTON III D.P., HINCHA D.K. and HEYER A.G.(2009) : Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cell Mol. Life Sci.*, 66, 2007-2023.
- 12) 農畜産業振興機構・『需給関係資料』。 http://sugar.alic.go.jp/japan/data/jd_data.htm.
- 13) SASAKI H., ICHIMURA K., ODA M.(1996) : Changes in Sugar Content during Cold Acclimation and Deacclimation of Cabbage Seedlings. *Ann. Bot.*, 78, 365-369.
- 14) SCHILLING N.(1982) : Characterization of maltose biosynthesis from α -D-glucose-1-phosphate in *Spinacia oleracea*. *L. Planta*, 154, 87-93.
- 15) SHAHBA M.A., QIAN Y.L., HUGHES H.G., KOSKI A.J. and CHRISTENSEN D.(2003) : Relationships of Soluble Carbohydrates and Freeze Tolerance in Saltgrass. *Crop Sci.*, 43, 2148-2153.
- 16) STITT M. and HURRY V.(2002) : A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 199-206.
- 15) THOMASHOW M.F.(1999) : Plant Cold Acclimation : Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 571-599.
- 16) 角田恵造、戸田義久(2009) : てん菜直播栽培の普及状況について(3) ～幕別町の事例～. 砂糖類情報 2月号, 16-23.
- 17) てん菜糖業年鑑(2011) : 北海道てん菜協会発行.
- 18) UEMURA M., JOSEPH R.A. and STEPONKUS P.L.(1995) : Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiol.*, 109, 15-30.
- 19) UEMURA M. and STEPONKUS P.L.(1994) : A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiol.*, 104, 479-496.
- 20) VOGEL J.T., ZARKA D.G., van BUSKIRK H.A., FOWLER S.G. and THOMASHOW M.F.(2005) : Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J.*, 41, 195-211.
- 21) WANNER L.A., JUNTTILA O.(1999) Cold-Induced Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 120, 391-400.
- 22) WOOD R.R., BREWBAKER H.E. and BUSH H. L.(1950) : Cold resistance in sugar beets. The Proceedings of the 6th General Meeting of American Society of Sugar Beet Technologist, 117-121.
- 23) WOOD R.R.(1952) : Selection for Cold Tolerance and Low Temperature Germination in Sugar Beets. The Proceedings of the 7th General Meeting of American Society of Sugar Beet Technologist, 407-410.
- 24) YANO R., NAKAMURA M., YONEYAMA T. and NISHIDA I.(2005) : Starch-related α -glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 138, 837-846.
- 25) YOSHIDA M., ABE J., MORIYAMA M. and KUWABARA T.(1998) : Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiol. Plant.*, 103, 8-16.
- 26) YOSHIDA M. and TAMURA K.(2011) : Research on Fructan in Wheat and Temperate Forage Grasses in Japan. *JARQ.* 45, 9-14.

Accumulation of Maltose in the Cotyledons of Sugar Beet in Response to Low Temperature

Hiroaki MATSUHIRA, Midori YOSHIDA and Yutaka SATO

Summary

In northern regions such as Hokkaido (Japan) , sugar beet seedlings soon after germination often suffer from extensive frost damage in spring, resulting in serious loss of yield. Enhancement of freezing tolerance at the early seedling stage is necessary for sugar beet cultivation. However, little is known about physiological responses of sugar beet to low temperatures and the ability of sugar beet to acquire freezing tolerance. Cold acclimation is enhancement of freezing tolerance by exposure to low, nonfreezing temperatures. In order to investigate the physiological responses of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings at the cotyledon stage to low temperatures, we analyzed

contents of soluble carbohydrates in cotyledons during incubation at low temperatures. The total amount of soluble carbohydrates remarkably increased during incubation for 7 days at 5°C or 10°C , though only a slight increase or no increase was observed at 15°C or 20°C . Identification of the individual components of carbohydrates revealed that the amount of maltose was two-times larger than that of sucrose in sugar beet cotyledons treated at 5°C . This finding will facilitate an understanding of the physiological response of sugar beet seedlings to a low temperature and the ability of sugar beet seedlings to acquire freezing tolerance.