



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	タマネギ鱗茎の品種間差に及ぼすフルクタン代謝メカニズムの研究
Author(s)	奥, 聡史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13592号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13592
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77068
Type	doctoral thesis
File Information	Satoshi_Oku.pdf



タマネギ鱗茎の品種間差に及ぼす
フルクタン代謝メカニズムの研究

北海道大学大学院 農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

奥 聡史

目次

第1章 緒言および研究史	1
第1節 タマネギ栽培の歴史	
第2節 タマネギに含まれる機能性成分フルクタンについて	
第2章 タマネギの生育に伴う鱗茎および葉身部におけるフルクタンの動態	10
第1節 材料および方法	
第2節 結果および考察	
第3章 タマネギにおけるフルクタン代謝酵素遺伝子の同定と機能解析	27
第1節 材料および方法	
第2節 結果および考察	
第4章 MALDI-TOF MS Imaging を利用したタマネギ鱗茎における フルクタン分布の可視化	50
第1節 材料および方法	
第2節 結果および考察	
第5章 アグロバクテリウムを用いたタマネギ形質転換体作出の試み	61
第1節 材料および方法	
第2節 結果および考察	
第6章 総合考察	70
摘 要	76
参考文献	78
謝辞	87

第1章 緒言および研究史

第1節 タマネギ栽培の歴史

タマネギ(*Allium cepa* L.)は、ユリ科(クロンキスト体系)またはヒガンバナ科(新エングラータ体系および APG 植物分類体系)ネギ属の多年草で、原産地は中央アジアと推定されている。最も古い栽培の歴史を持つ作物の1つであり、紀元前5千年にペルシャ地域から食用利用が始まったとされる。古代エジプトやギリシャ、ローマ時代を経て、15～16世紀頃にはヨーロッパ帯に広まり、民間療法的に風邪や胃腸薬、また切り傷の治療薬として幅広く利用されてきた。アメリカには16世紀以降に導入され、南方亜熱帯から寒帯までのアメリカ全土にタマネギ栽培が広がっている。アメリカでの普及において、タマネギは各環境に応じた著しい生態的分化を遂げ、これによりアメリカ各地での周年供給が可能となっている(加藤, 1999)。日本には、明治以降に食用タマネギが導入された。北海道では、明治4年にアメリカ系‘イエロー・グローブ・ダンバース’が導入され、その後‘札幌黄’となって普及した。大阪近郊では、明治17年にアメリカ系‘イエロー・ダンバース’が導入され、‘泉州黄’となって普及している。さらに、愛知近郊では、大正初期にフランス系‘ブラン・アチーフ・ド・パリ’が導入され、現在の‘愛知白’となって普及している。その後、各地の農家や農協・種苗会社において自家採種・選抜が行われ、食味、収量性、貯蔵性などに特色のある様々な品種が作られ、日本全国でタマネギ栽培が盛んに行われてきた(加藤, 1999; 八鍬, 1975)(第1～2図)。

日本におけるタマネギ栽培の作型は、北海道で行われる春まき栽培と、府県で行われる秋まき栽培の2種類がある。これらの作型は、品種によって異なる日長感応性や早晩生に対応するように考案されてきたものと考えられている(大西・田中, 2012)。これまで秋まき栽培を行っていた東北地方や北陸地方でも、冬の積雪や春先の抽苔による被害を避けるために近年では春まき栽培も普及しつつある(山崎, 2016)。

第2節 タマネギに含まれる機能性成分フルクタンについて

タマネギの鱗茎には、抗酸化作用のあるケルセチン配糖体、大腸内の環境を整えるなどのプレバイオティクス作用を持つフルクタン(フルクトオリゴ糖)および血栓溶解作用を持つ硫化アリルなどが豊富に含まれており、消費者から健康野菜として認知されている(Jaime et al., 2000; Vågen and Simestad, 2008; Platel and Srinivasan, 2016)。タマネギが健康野菜として注目されるきっかけとなったのは、1960～1980年代にオランダや日本などで行われた野菜や果

物の摂取による疫学調査の結果である(Hertog et al, 1993)。ケルセチン配糖体と含硫化合物の効果については多くの報告例があり、その成果の一部が育種へ応用され、‘クエルゴールド’ (国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構)、『さらさらレッド’ (株式会社植物育種研究所)、『スマイルボール’ (ハウス食品グループ本社株式会社)などの機能性タマネギ品種が登場している。

フルクタンは水溶性食物繊維であり、スクロースにフルクトースが重合した多糖である。フルクトースの重合度(Degree of polymerization, DP)は植物種によって異なり、ゴボウやキクイモではDP20~30程度、チョウセンアザミや牧草類ではDP 100~250となるものもある。フルクタンのうち、重合度10以下のものはフルクトオリゴ糖とも呼ばれる。フルクタンは、ヒトにとっては整腸作用や糖尿病の予防に効果があるとされる(Gibson and Roberfroid, 1995)。一方、植物にとっては、休眠時や萌芽時のエネルギー源として利用されるだけでなく、低温・乾燥ストレス耐性にも関わるとされ、フルクタンが細胞膜に結合することで細胞の形を維持する効果があるとされている(Shiomi et al., 1997, 2005; Darbyshire and Henry, 1978)。植物種によって、フルクタンの構造も異なっており、直鎖タイプと枝分かれタイプから構成されるため(Vijn and Smeekens, 1999)、フルクタンの構造は以下の6種類に大別される(Van den Ende, 2013; Van Arkel et al., 2013, 吉田ら, 2003)(第3図)。

- ① イヌリンタイプ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基に、 $\beta(2\rightarrow1)$ 結合でつながったフルクトース鎖をもつ直鎖構造のフルクタン
- ② イヌリンネオシリーズ: イヌリンタイプの $\beta(2\rightarrow1)$ 結合フルクトース鎖に加えて、スクロース内のグルコース6位炭素の水酸基に $\beta(2\rightarrow6)$ 結合でフルクトースが結合し、そこからさらに $\beta(2\rightarrow1)$ 結合でつながったフルクトース鎖が伸びる枝分かれ構造のフルクタン
- ③ レバンタイプ: スクロース内のフルクトース6位炭素の水酸基に、 $\beta(2\rightarrow6)$ 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン
- ④ レバンネオシリーズ: レバンタイプのフルクトース鎖に加えて、スクロース内のグルコース6位炭素の水酸基にも $\beta(2\rightarrow6)$ 結合でつながったフルクトース鎖が伸びるフルクタン
- ⑤ グラミナンタイプ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基に、 $\beta(2\rightarrow1)$ 結合と $\beta(2\rightarrow6)$ 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン。
- ⑥ ネオグラミナンタイプ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基およびスクロース内のグルコース6位炭素の水酸基の両方に、 $\beta(2\rightarrow1)$ 結合と $\beta(2\rightarrow6)$ 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン。

この中でタマネギ、アスパラガスおよびニンニクは、イヌリンタイプとイヌリンネオシリーズのフルクタンを蓄積し、重合度は3~12までの構造を取る(Shiomi, 1989; Baumgartner et al., 2000; Fujishima et al., 2005)。ネオグラミナンシリーズのフルクタンとしては、Agave属植物で蓄積して

いるAgavinが知られている (Mancilla-Margalli and López, 2006; López and Urías-Silvas, 2007)。

フルクタン蓄積・分解に関わるフルクタン合成酵素およびフルクタン分解酵素は、糖質加水分解酵素ファミリー (GH32) に属する β -フルクトシダーゼの1種である。フルクタンの合成は、スクロースを出発点としてはじまる (Ritsema and Smeekens, 2003; Vijn and Smeekens, 1999; CAZy, Cantarel et al., 2009)。タマネギにおけるフルクタン合成・分解経路を第4図にまとめた。タマネギのフルクタン合成酵素であるフルクトシルトランスフェラーゼは3種類あると考えられている (Fujishima et al., 2005; Benkeblia et al., 2005)。スクロース:スクロース 1-フルクトシルトランスフェラーゼ (1-SST) (EC 2.4.1.99) は、スクロースから1-ケストースを合成する酵素で、すべてのフルクタン蓄積植物がこの酵素を持つ。1-SSTは、スクロースのフルクトース残基を他のスクロースのフルクトース残基に β (2 $\rightarrow$ 1)で転移することで1-ケストースを合成する。ムギ類でみられる6-SST (スクロース:フルクタン 6-フルクトシルトランスフェラーゼ) は、フルクトース間の β (2 $\rightarrow$ 6)結合に関わり、スクロースのフルクトース残基を他のスクロースのフルクトース残基に β (2 $\rightarrow$ 6)で結合させて6-ケストースを合成する。また、6-SFTはスクロース以外にもフルクタンをフルクトースドナーとして利用する。フルクタン:フルクタン 1-フルクトシルトランスフェラーゼ (1-FFT) (EC 2.4.1.100) は、フルクタン (1-ケストース、ネオケストース、6-ケストースおよびさらに重合させたものを含む) のフルクトース残基のC1へフルクトースを β (2 $\rightarrow$ 1)結合でつないで高重合度フルクタンを合成する酵素である (Van den Ende et al., 2006)。1-FFTは、フルクタンのみをフルクトースドナーに利用するため、スクロースをフルクトースドナーとする1-SSTとは認識する基質が異なっている。フルクタン:フルクタン 6G-フルクトシルトランスフェラーゼ (6G-FFT) (EC 2.4.1.243) は、イヌリンタイプ、レバンタイプさらにグラミナンタイプのフルクタンにおいて、スクロース内のグルコース6位炭素からフルクトースを枝分かれさせるように、 β (2 $\rightarrow$ 6)結合でフルクトースをグルコースへ転移する。タマネギやAgave sp.で6G-FFTが報告されている (Vijn et al., 1997; Ueno et al., 2005; Cortes-Romero et al., 2012)。高重合度のレバン型フルクタン鎖 [β (2 $\rightarrow$ 6)結合でフルクトース鎖を伸ばす] の合成には6-FFTが関わりと考えられるが、精製酵素や遺伝子の報告はない。

一方、フルクタン分解酵素は、フルクタンエキソヒドロラーゼ (FEH) と呼ばれており、主に β (2 $\rightarrow$ 1)結合を加水分解する1-FEH、主に β (2 $\rightarrow$ 6)結合を加水分解する6-FEH、さらにその両方の活性を持つ6&1-FEHがある。タマネギの場合では1-FEH (EC 3.2.1.153) が存在していると考えられている (Fujishima et al., 2005; Benkeblia et al., 2005)。最近の研究報告では、フルクトース-フルクトース間の β (2 $\rightarrow$ 1)結合だけでなく、フルクトース-グルコース間の β (2 $\rightarrow$ 6)結合も切断し分解する6G&1-FEHという新しいフルクタン分解酵素があることも報告されている (Ueno et al., 2018)。ほとんどのフルクタン分解酵素はスクロースを基質として利用しないとされ、チコリーのフルクタン分解酵素ではスクロースにより活性が阻害されることが報告されている (Verhaest et al., 2007)。

これまで、日本国内で栽培される様々なタマネギ品種を使って、収穫した鱗茎に含まれるフルクタン含量や組成を評価したところ、顕著な品種間差があることが明らかになった (Maeda et

al., 2017; 第5図)。特に、‘北もみじ2000’はフルクタン含量が高く、DP8までのフルクタンが蓄積していたのに対し、‘ポールスター’はフルクタン含量が低く、DP7程度のフルクタンしか蓄積しておらず、代わりに、フルクトースやグルコースの単糖類が多く蓄積していた。また、タマネギの生育後期のフルクタン蓄積や合成・分解の代謝酵素活性を行った報告では、合成酵素活性は生育後期に横ばいもしくは若干の低下であったが、インベルターゼ活性は、生育後期から収穫にかけて低下していた(Shiomi et al., 1997)。さらに、収穫後貯蔵期の報告では、1-FFT活性は収穫後約3か月後に一時的に増加し、6G-FFT活性は収穫後約4か月後まで一定だったのに対して、1-FEH活性と1-ケトース分解活性は、収穫後約3か月後に1-FFTと同様に急激に上昇していたことから、フルクタンが休眠や萌芽にも関連があるとしている(Benkeblia et al., 2005)。タマネギにおけるフルクタン含量や組成の品種間差を生み出す原因は、フルクタン合成酵素・分解酵素および、その酵素をコードする遺伝子の違いによるとも考えられる。タマネギでは、フルクタン合成・分解に関与する1-SST、6G-FFT、インベルターゼの遺伝子同定や精製酵素の解析は行われており、6G-FFTが1-FFT様活性を持っていることが報告されている(Shiomi 1989; Vijn et al., 1997; Fujishima et al., 2005)。しかし、フルクタン分解酵素の1-FEHはまだ単離・同定されていない。

本研究では、タマネギでまだ発見されていないフルクタン分解酵素の1-FEHを単離・同定し、その機能を解析すること、また、タマネギ鱗茎中のフルクタン分布を可視化することで、フルクタン合成・分解の代謝メカニズム解明の手掛かりとし、フルクタン含量・組成の品種間差の原因を明らかにする基礎的知見を得ることを目的とした。

本論文は、第1～6章、摘要、謝辞および参考文献で構成されている。第1章では、緒言および研究史として、タマネギ栽培や様々な品種、そして機能性成分であるフルクタンの概要について述べた。第2章では、タマネギ鱗茎および葉身部の生育期間中のフルクタン動態を明らかにするため、フルクタン含量および、鱗茎から抽出した粗酵素のフルクタン合成・分解酵素の活性を調査した。第3章では、フルクタン分解酵素の単離および機能解析を行った。第4章では、収穫物の鱗茎中に含まれるフルクタンの分布を明らかにするため、MALDI-TOF MS Imagingを利用してフルクタンの局在を可視化した。第5章では、アグロバクテリウムを用いたタマネギ組換え体の作出を検討した。最後に第6章では、第1～6章で得られた結果について総合的な考察を行った。



北はやて2号
(タキイ)



オホーツク222
(七宝)



ポールスター
(渡辺採種場)



北もみじ2000
(七宝)



スーパー北もみじ
(七宝)



レッドアイアーリー
(タキイ)

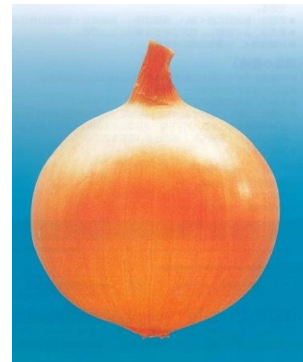
品種名	熟期	抽苔性	乾腐病	規格内率	規格内収量	鱗茎の大きさ	外観品質	貯蔵性
北早生3号	極早生	強い	並	並	並	並	並	—
北はやて2号	極早生	強い	並	やや良	やや多収	並	やや良	—
パレットペア	極早生	強い	やや強い	やや良	やや多収	やや大	やや良	—
Dr.ピルシー	極早生～早生	並	並	並	並	大	並	—
TTA-746	早生	強い	やや強い	やや良	やや多収	やや大	やや良	並
オホーツク222	早生	やや強い	強い	良	多収	やや大	良	やや良
ウルフ	中早生	並	並	やや良	やや多収	やや大	並	並
パワーウルフ	中早生	やや強い	やや強い	やや良	やや多収	やや大	やや良	並
北こがね2号	中早生	やや強い	並	やや良	やや多収	やや大	やや良	並
ポールスター	中早生	やや強い	やや強い	やや良	やや多収	やや大	良	並
カムイ	中生	やや強い	並	やや良	やや多収	やや大	やや良	並
北もみじ2000	中生	やや強い	強い	良	多収	やや大	良	極良
ブラウンペア	中生	やや強い	強い	良	多収	やや大	良	やや良
イコル	中晩生	やや強い	やや強い	やや良	多収	大	良	やや良
スーパー北もみじ	中晩生	強い	強い	良	多収	やや大	良	良
ベガス	中晩生	並	強い	やや良	多収	極大	並	並
コディアック	中晩生	やや強い	強い	良	多収	やや大	良	やや良
北海天心	中晩生～晩生	やや強い	やや強い	やや良	多収	やや大	やや良	やや良
玉灯り	晩生	やや強い	強い	良	多収	大	良	やや良
レッドアイアーリー	中生	やや強い	並	やや良	やや多収	やや大	やや良	並
レッドアイアーリーⅡ	中晩生	やや強い	やや強い	良	やや多収	やや大	良	やや良

第1図 春まきタマネギの品種特性

(ホクレン農業協同組合連合会, 東北農研, 北海道野菜地図35(2012), 蔬菜の新品種7(1978)より引用)
熟期表記は、北海道慣例に従って作成. 赤字は、赤タマネギを示す.



貴錦
(カネコ)



ターザン
(七宝)



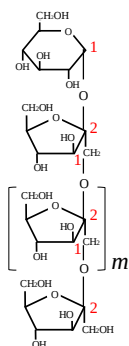
ネオアース
(タキイ)



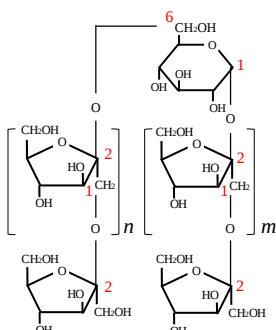
湘南レッド
(サカタ)

品種名	熟期	鱗茎の大きさ	貯蔵性
貴錦	極早生	やや大	並
プレスト3	極早生	並	並
T-357	早生	やや大	並
七宝早生7号	早生	やや大	並
アンサー	中早生～中生	大	やや悪
ターザン	中生	やや大	極良
さつき	中生	やや大	良
ターボ	中生	やや大	良
ネオアース	中生～中晩生	やや大	良
もみじ3号	中晩生	やや大	極良
湘南レッド	中生	やや大	やや悪
くれない	中晩生	やや大	良

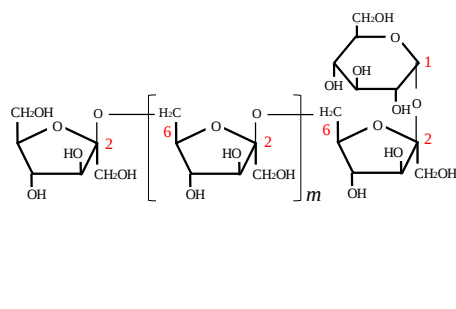
第2図 秋まきタマネギの品種特性
(農業技術大系野菜編8-②およびタマネギの作業便利帳(2012)より引用)
熟期表記は、府県慣例に従って作成。赤字は、赤タマネギを示す。



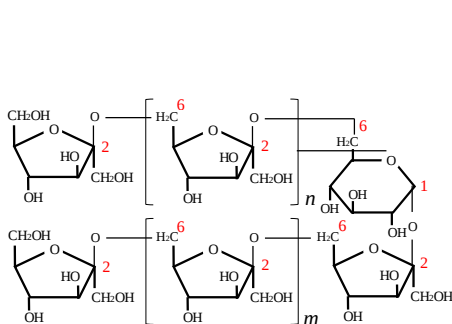
① Inulin type



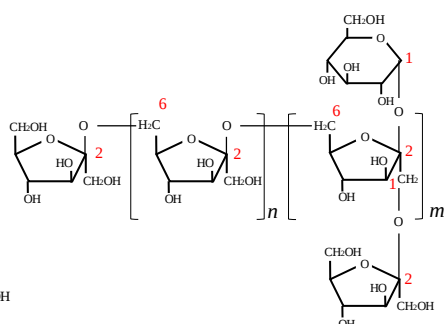
② Inulin neo-series



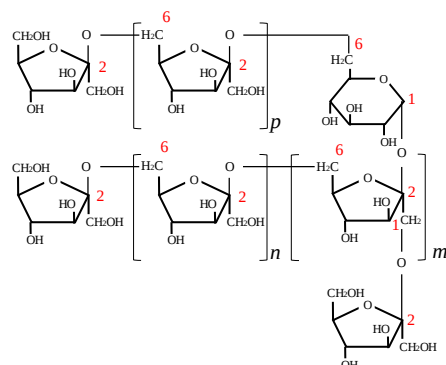
③ Levan type



④ Levan neo-series



⑤ Graminan type



⑥ Neo graminan series

第3図 高等植物におけるフルクタン構造様式

①イヌリンタイプ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基に、 β (2 $\rightarrow$ 1) 結合でつながったフルクトース鎖をもつ直鎖構造のフルクタン。

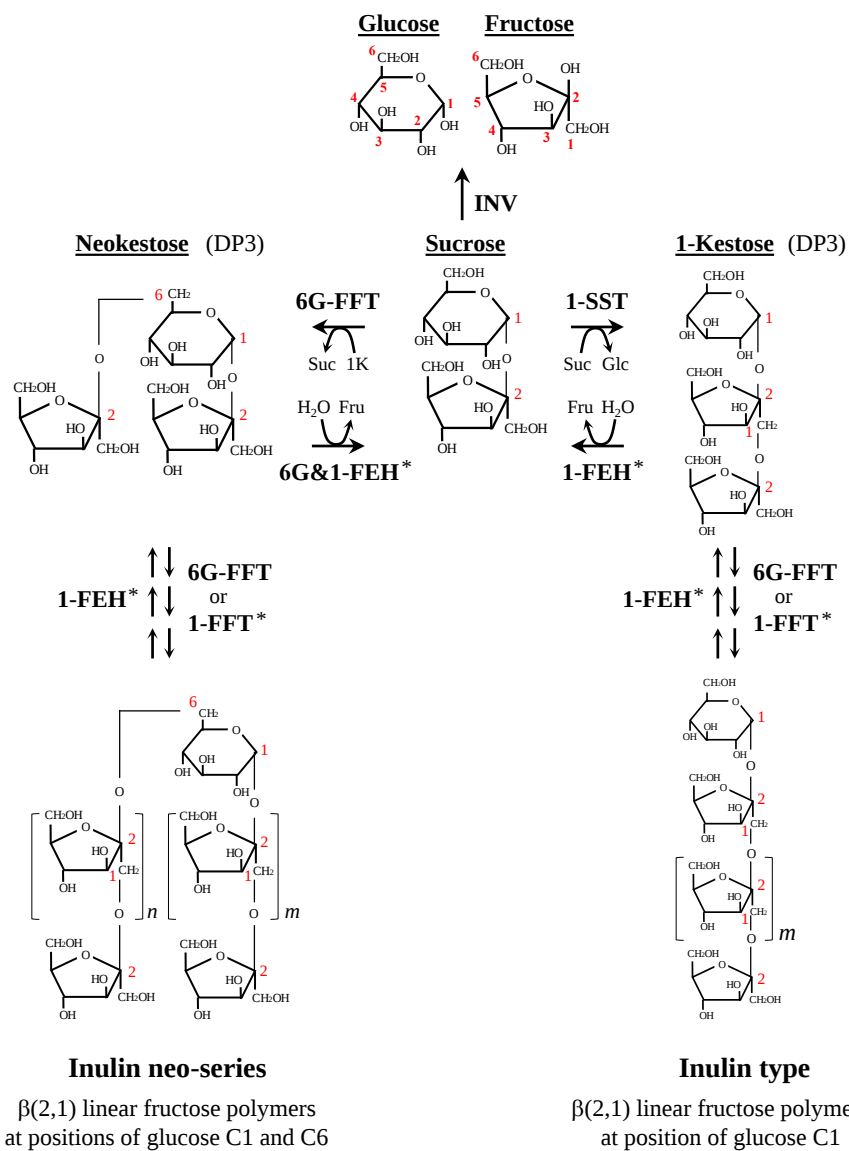
②イヌリンネオシリーズ: イヌリンタイプの β (2 $\rightarrow$ 1) 結合フルクトース鎖に加えて、スクロース内のグルコース6位炭素の水酸基に β (2 $\rightarrow$ 6) 結合でフルクトースが結合し、そこからさらに β (2 $\rightarrow$ 1) 結合でつながったフルクトース鎖が伸びる枝分かれ構造のフルクタン。

③レバンタイプ: スクロース内のフルクトース6位炭素の水酸基に、 β (2 $\rightarrow$ 6) 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン。

④レバンネオシリーズ: レバンタイプのフルクトース鎖に加えて、スクロース内のグルコース6位炭素の水酸基にも β (2 $\rightarrow$ 6) 結合でつながったフルクトース鎖が伸びるフルクタン。

⑤グラミナントタイプ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基に、 β (2 $\rightarrow$ 1) 結合と β (2 $\rightarrow$ 6) 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン。

⑥ネオグラミナンシリーズ: スクロース内のフルクトース1位炭素の水酸基およびスクロース内のグルコース6位炭素の水酸基の両方に、 β (2 $\rightarrow$ 1) 結合と β (2 $\rightarrow$ 6) 結合でつながったフルクトース鎖をもつフルクタン。

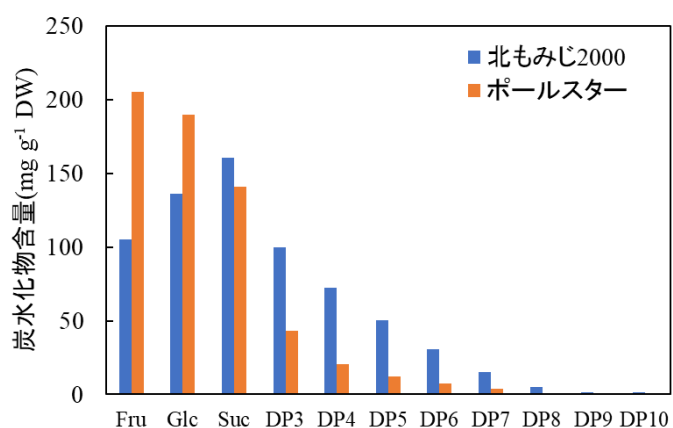


第4図 フルクトタン合成・分解経路

1-SST, sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase; 1-FFT, fructan: fructan 1-fructosyltransferase; 6G-FFT, fructan: fructan 6G-fructosyltransferase; INV, invertase; 1-FEH, fructan 1-exohydrolase; 6G&1-FEH, fructan 6G&1-exohydrolase; Suc, Sucrose; Fru, Fructose; Glc, Glucose; 1K, 1-kestose.

*, These enzymes and cDNAs have not been identified yet in onion.

品種	mg g ⁻¹ DW
北もみじ2000	274.4
ケルたま	265.8
オホーツク222	263.6
もみじ3号	220.7
マルソー	216.2
ポールスター	86.2
東京レッド	49.3



第5図 タマネギ鱗茎収穫物中のフルクタン含量(Maeda et al., 2017より一部引用)

第2章 タマネギの生育に伴う鱗茎および葉身部におけるフルクタン動態

タマネギ鱗茎の収穫物中のフルクタン含量には顕著な品種間差があることが分かっていたが(Maeda et al., 2017)、そのようなフルクタン含量の品種間差を生じる分子メカニズムは不明である。本研究では、タマネギ鱗茎のフルクタン含量の違いをもたらす要因としてフルクタン合成・分解酵素の働きの違いに着目している。これまでに、鱗茎肥大直後から収穫時までの鱗茎フルクタン含量や酵素活性についての品種別評価や(Shiomi et al. 1997)、収穫後の貯蔵中におけるフルクタン含量や酵素活性の評価(Benkeblia et al. 2005)の報告がある。しかし、定植から収穫までの生育期間全体についてフルクタン含量や酵素活性を調べた研究例はない。そのため、生育期から収穫期のフルクタン蓄積の推移を網羅的に把握することが重要であり、同時にフルクタン含量と組成の品種間差が初めて起こる時期を明らかにすることができる。

本章では、収穫物の鱗茎のフルクタン含量が異なる2品種のタマネギを用いて、定植から収穫までの生育期間全体における鱗茎のフルクタン含量およびフルクタン合成・分解酵素の活性を測定し、鱗茎のフルクタン含量に及ぼすフルクタン代謝酵素の影響を調べた。また、タマネギのフルクタンを分析する研究は食用部位である鱗茎でのみ行われている。本章では、鱗茎部位だけでなく地上部葉身組織にも注目し、葉身におけるフルクタン含量の品種間差や鱗茎フルクタン蓄積への影響についても調べた。

第1節 材料および方法

(1) 植物材料

タマネギ品種には、収穫した鱗茎のフルクタン含量が高い‘北もみじ 2000’、およびフルクタン含量が低い‘ポールスター’を用いた。種子は2016年2月26日に北海道農業研究センター(札幌市)の温室内(25℃)に播種して育苗を行った。2016年4月26日、同施設の研究圃場に、畝幅120 cm、畝間100 cm、条間30 cm、株間10 cmの4条植えで、栽植密度 1.82×10^5 株・ha⁻¹となるように定植した。2017年にも、同様の条件でこの2品種を栽培した(2017年2月27日播種、4月27日定植)。2カ年とも、施肥は高度化成肥料の基肥のみとし、施肥量 N: P₂O₅: K₂O = 15:10:10 kg・10⁻¹ a となるように散布した。定植日と定植後2週間おきに収穫まで、20~30株ずつ採取した。倒伏日は、品種ごとに、全体の約80%が倒伏した時とした。倒伏日の2週間後、茎葉の黄化が進んでから収穫を行った(2016年、2017年ともに最終収穫日

は 8 月 18 日)。各サンプリング日に採取した材料は、形態調査を終えた後、地上部葉身部分(黄化や枯死した部分を除いた緑色の葉身部分)と鱗茎部分に分け、液体窒素中で凍結させてから-30℃で保存した。炭水化物分析には、凍結乾燥したサンプルを家庭用フードミルで粉碎し、凍結乾燥粉末として実験に用いた。

(2) 形態調査

各採取日のサンプル 15~20 株について、草丈、生葉数、葉鞘径および鱗茎の横径を計測した。また、横径/葉鞘径の値を算出して鱗茎の肥大度とした。2017 年のみ、鱗茎部分の生重および乾物重を測定し、含水率を測定した。

(3) 炭水化物の抽出

遊離糖およびフルクタンを含む炭水化物は既報を参考にして抽出した(Downes and Terry, 2010; Maeda et al., 2017)。すなわち、凍結乾燥粉末 10 mg を 1.5 mL チューブに秤量し、90℃で 20 分間湯浴を行い、糖やフルクタンの合成・分解に関わる酵素を失活させた。その後、90℃の熱水 1 mL を加え、さらに 90℃で 1 時間湯浴し熱水抽出を行った。放熱後に 4℃で遠心分離(10,000 rpm, 5 分)を行い、上清を回収して高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析の試料とした。

(4) HPLC-ELSD

遊離糖とフルクタンの検出は、HPLC に蒸発光散乱検出機(ELSD)を取り付けた機器を用いて行った。HPLC 条件は、次の通りである。ポンプ:L-6200 intelligent pump (Hitachi, Tokyo, Japan)、カラム温度:40℃、カラム:Asahipak NH2P50-4E column (4.6 × 250 mm, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan)、移動相;アセトニトリル(A)/水(Milli-Q) (B)のグラジエント(0 分, A:B = 78 : 22, 25 分, A:B = 0 : 100, ポストランニングタイム 15 分)、流量:0.7 mL・min⁻¹、注入量:10 μL。検出器:Model 300S ELSD (M&S Instruments, Osaka, Japan)。

フルクトース、グルコース、スクロース、1-kestose (DP3)、ニストース (DP4) について、0 (Milli-Q)、125、500、1000 ppm の標準液を調製し、この標準液を用いて検量線を作製した。各標品は、フルクトース(ナカライテスク)、グルコース(ナカライテスク)、スクロース(ナカライテスク)、1-kestose (富士フィルム和光純薬工業)、ニストース(富士フィルム和光純薬工業)を用いた。各サンプルのフルクトース、グルコース、スクロースはそれぞれの検量線から直接定量を行った。HPLC-ELSD では、フルクタンのアイソフォーム(DP3 の場合、1-kestose およびネ

オケストース、DP4 の場合、ニストース、1,6G-kestotetraose および 1&6G-kestotetraose)を区別できない。そのため、サンプル中の DP3 フルクタンはまとめて 1-ケストース等量、DP4 フルクタンはまとめてニストース等量としてそれぞれの検量線より定量した。DP5 以上のフルクタンは標準品が入手できないため、サンプル中の DP5 以上のフルクタンは、ニストースの検量線を用いてニストース等量として算出した。

(5) 粗酵素抽出

抽出作業はすべて 4℃または氷上で行った。Shiomi et al. (1997)および Ueno et al. (2005)を参考にして鱗茎部位からの粗酵素抽出を行った。凍結組織 5 g を乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨砕した。粉末は 50 mL チューブに移し、15 mL の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5)を加えて十分にホモジナイズした。4℃で遠心分離 (10,000×g, 60 分)した後、上清を新しい 50 mL チューブに移し、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5)を加えて 20 mL にメスアップした。半分量にあたる 10 mL を Vivaspin20 (ザルトリウス)に加え、4℃で遠心分離 (8,000×g, 30 分)し、限外ろ過により 1 mL まで濃縮した。試料中に残存するオリゴ糖や塩類を除去するため、10 mL の 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.5)を加え、4℃で遠心分離して 1 mL まで濃縮した。これを 2 回繰り返した。濃縮液を 1.5 mL チューブに回収したものを粗酵素液とし、以後の酵素反応に用いた。

(6) 酵素反応

粗酵素液に含まれるフルクタン合成酵素 (1-SST、6G-FFT、1-FFT)、フルクタン分解酵素 (1-FEH) およびインベルターゼ (INV) について、各々の活性を評価した。粗酵素液 25 μL、McIlvaine 緩衝液 (pH5.5) 25 μL、基質 50 μL を加えて 100 μL とし、30℃で反応させた。反応 0.5、2、4、8 時間で反応液を 25 μL ずつ回収し、回収した反応液を 100℃で 3 分間処理して酵素反応を停止させた。1-SST と INV の活性評価では、0.2 M のスクロースを基質として用いた。6G-FFT、1-FFT、1-FEH の活性評価では、0.2 M の 1-ケストースを基質として用いた。反応停止させた後、Milli-Q 水で適宜希釈したものを HPAEC-PAD の分析試料として用いた。

(7) HPAEC-PAD

酵素反応生成物を詳細に測定するため、Shiomi (1993)の方法に従い、陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) にパルスドアンペロメトリ検出器 (PAD) を取り付けた機器を用いて分析を行った。HPAEC-PAD の分析条件は、以下の通りである。システム・カラムオープン・検出器：

Thermo Scientific; DIONEX ICS-5000+ (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)、カラム温度: 30°C、カラム: CarboPak PA1 column (4 × 250 mm, Thermo Scientific, Massachusetts, USA)、移動相; 150 mM 水酸化ナトリウム溶液 (A) / 0.5 M 酢酸ナトリウム溶液 (B) のグラジエント (0 分, A:B = 95 : 5, 2 分, A:B = 90 : 10, 20 分, A:B = 60 : 40, 22 分, A:B = 0 : 100, 30 分, A:B = 95 : 5)、流量: 1.0 mL min⁻¹、注入量: 25 µL。

フルクトース、グルコース、スクロース、1-kestose (DP3)、ネオkestose (アスパラガス根抽出物から精製, DP3)、ニストースおよび 1&6G-kestotetraose (アスパラガス根抽出物から精製 DP4) について、2、10、20 µg mL⁻¹ の標準液を調製して検量線を作成して、反応液中に含まれる各糖の定量を行った。酵素活性は、1 分間に 1 µmol の反応生成物を作り出す酵素の量を 1 unit (U) とし、U g⁻¹ FW として算出した。反応生成物は、1-SST 活性を算出する場合には 1-kestose 含量、1-FFT 活性を算出する場合にはニストース含量、6G-FFT 活性を算出する場合にはネオkestose 含量と 1&6G-kestotetraose 含量、INV と 1-FEH 活性を算出する場合にはフルクトース含量としてそれぞれの含量を算出し、各酵素の活性とした。

第2節 結果および考察

I. 生育期間全体を通じた鱗茎形成の外的変化

2016 年と 2017 年に栽培した‘北もみじ 2000’および‘ポールスター’について、定植日から収穫日までの鱗茎の写真を第 6 図に示した。また、各サンプリング時における草丈、生葉数、葉鞘径、鱗茎の横径、横径/葉鞘径を第 7 図に示した。‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’は生育期間全体を通してほぼ同様の生育傾向を示した。2017 年では、定植後の 5 月 12 日と 5 月 26 日に一時的に生育が抑制されていたが、6 月 9 日以降は徐々に株は発達し、倒伏日前の 7 月 21 日に生育のピークを迎えた。草丈は、収穫日の 8 月 18 日において‘北もみじ 2000’が‘ポールスター’よりも高い傾向を示していた。生葉数と葉鞘径は、7 月 21 日以降から収穫日までの間で‘北もみじ 2000’が‘ポールスター’よりも高い傾向であった。2016 年の場合も同様であり、5 月中の生育は緩慢であったが、6 月以降に発達が盛んになり、7 月 21 日に生育のピークを迎えた。2017 年と同様の傾向を示し、品種間で有意な違いはみられなかった。2016 年、2017 年どちらにおいても 5 月中の生育が緩慢だったのは、根の活着や温室から圃場への環境順応が優先されたために、草勢を大きくするためのエネルギーが十分に行き渡らなかったからと考えられる。

鱗茎の横径の成長は、両品種とも同様の傾向を示した。2017 年の場合は、6 月 23 日まで鱗茎肥大は緩慢であったが、7 月 7 日以降から収穫日にかけて急激に鱗茎肥大が起こった。2016 年の場合も 7 月 5 日以降に鱗茎肥大が急激に起こっていた。横径/葉鞘径の値は、2.0 以上になると鱗茎肥大が開始したとみなされる(北海道立総合研究機構農業研究本部 花・野菜技術センターの指標より。幼苗期はこの基準から除く)。両品種とも、2017 年では 7 月 7 日と 7 月 21 日の間に、2016 年では 7 月 5 日と 7 月 21 日の間に値が 2.0 以上になっていたことから、この期間に鱗茎肥大が開始したと考えられる。両品種とも、鱗茎の生重は定植日から肥大開始期までは若干しか増加しなかったが、鱗茎肥大開始後の 7 月 21 日以降から収穫日までは急増していた。また乾物重の増加も同様の傾向であった。含水率は、両品種とも定植後の 5 月中は一時的に減少したが、6 月以降から約 90%で推移していた(データ略)。

II. 鱗茎中のフルクタン含量および組成

生育期間全体における‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’の鱗茎中のフルクトース、グルコース、スクロース、フルクタン含量の推移を第 8 図に示した。総糖含量は、‘北もみじ 2000’が $249.9\sim 612.0\text{ mg g}^{-1}\text{ DW}$ 、‘ポールスター’が $268.9\sim 622.0\text{ mg g}^{-1}\text{ DW}$ の間で推移し、品種間で大きな違いはなかった。グルコース含量は、両品種とも定植日の 4 月 27 日から 5 月 12 日にかけて一時的に減少した後、5 月 26 日から 7 月 21 日にかけて増加した。その後、収穫日の 8 月 18 日までは緩やかに減少していた。フルクトース含量は、4 月 27 日から 7 月 21 日まででは両品種ともグルコースの推移と類似していたが、8 月 4 日以降、‘北もみじ 2000’は緩やかに減少したのに対して‘ポールスター’はほとんど変化しなかった。生育期間のほとんどで、グルコース含量およびフルクトース含量は‘ポールスター’が‘北もみじ 2000’よりも高い傾向であった。一方、スクロース含量は両品種とも同様の推移を示し、生育期間中に品種間差は見られなかった。どちらの品種も、定植後から 6 月 23 日までスクロース含量はほぼ一定であり、その後収穫日にむけて大きく増加した。

生育期間中の鱗茎のフルクタン含量は、‘北もみじ 2000’が $39.7\sim 293.5\text{ mg g}^{-1}$ 、‘ポールスター’が $24.5\sim 286.5\text{ mg g}^{-1}$ であり、それほど大きな違いはなかった。定植日から定植直後の 5 月 12 日にかけて、両品種ともにフルクタン含量は急増し、その後 7 月 7 日までに定植日とほぼ同等のフルクタン含量まで減少した。その後、鱗茎肥大に伴って、7 月 21 日以降フルクタン含量は増加した。定植日から 7 月の間、両品種ともフルクタン含量は同様の推移を示し、品種間差はみられなかった。フルクタン含量の品種間差は 8 月 4 日以降に現れ、‘北もみじ 2000’のフルクタン含量が‘ポールスター’よりも有意に高かった。

生育期間中のフルクタン組成別(DP3~12)含量の推移を第9~10図に示した。定植日の鱗茎は、両品種ともDP3~6のフルクタンを蓄積しており、‘北もみじ2000’の方が‘ポールスター’よりもDP3とDP4の含量が有意に高かった。フルクタン含量が高かった5月12日の鱗茎では、両品種ともDP3~12のフルクタンを蓄積しており、この時期は収穫時よりも重合度の高いフルクタンが合成されていることが分かった。また、統計的に有意ではなかったものの、‘ポールスター’の方で特に高重合度のフルクタンは多く蓄積している傾向がみられた。フルクタン含量が減少する5月26日から7月7日までの間、高重合度のフルクタンは徐々に消失し、7月7日には蓄積していたフルクタンの重合度はDP3~7程度まで低下した。肥大期間である7月21日以降、フルクタン含量は増加したが、重合度はDP3~8程度であった。収穫日の8月18日、DP3~8のフルクタンが鱗茎に蓄積していたが、すべてのDPにおいて‘北もみじ2000’の方が‘ポールスター’よりも有意に多くのフルクタンを蓄積していることが示された。

同様の解析を2016年に栽培した材料を用いて行ったが、生育期間中の糖およびフルクタン含量の推移は、スクロースを除いておおそ一致していた。2017年の場合、生育期間中のスクロース含量の品種間差はみられなかったのに対して、2016年の場合は、肥大期間である7月21日以降のスクロース含量は‘北もみじ2000’において‘ポールスター’よりも有意に高くなっていた。一方、グルコースおよびフルクトース含量は2017年と同様の傾向を示し、‘ポールスター’の方で高い期間が多い傾向であった。フルクタン含量も2017年と同様の傾向を示し、定植から7月中までは2品種にフルクタン含量の違いはみられず、8月以降になってから、‘北もみじ2000’では‘ポールスター’よりも有意に多くフルクタンが蓄積していた。両年の生育期間中の最高気温の推移は、2016年は8月上旬、2017年は7月上旬にピークを迎えていた(北海道農業研究センターの気象観測データ)ため、暑さのピークの時期の違いが糖蓄積にも影響している可能性も考え得る。

本研究では、生育期間全体における鱗茎の糖およびフルクタンの組成と含量の推移を調べたが、定植直後の5月12日にフルクタン含量が急増し、その後、7月7日までフルクタン含量が減少するという結果が2ヶ年続けて得られた。フルクタンの再蓄積が起こるのは7月21日以降であり、また、フルクタン含量の品種間差がみられたのは8月4日以降であった。

III. 葉身中のフルクタン含量および組成

‘北もみじ2000’と‘ポールスター’の葉身中のフルクトース、グルコース、スクロース、フルクタン含量の推移を第11図に示した。総糖含量は、‘北もみじ2000’は158.4~356.6 mg g⁻¹ DW、‘ポールスター’は167.2~357.0 mg g⁻¹ DWの間で推移していた。グルコース含量とフルクトー

ス含量は、両品種ともおおよそ同様の傾向で推移していた。定植日から6月23日までの生育前半では、‘ポールスター’でグルコースとフルクトース含量が高い傾向であったが、7月7日以降の生育後半では、‘北もみじ 2000’でグルコースとフルクトース含量が高い傾向であった。葉身のスクロース含量は、鱗茎肥大直前の6月23日に急減したのが特徴として挙げられ、鱗茎肥大や倒伏とも関係があるかもしれない。7月7日からスクロース含量は再び増加したが、7月21日から8月18日の鱗茎肥大開始期間では‘北もみじ 2000’のスクロース含量が‘ポールスター’と比べて高く蓄積していた。

生育期間中、DP3以上のフルクタンを積算した葉身のフルクタン含量は、‘北もみじ 2000’は0~57.8 mg g⁻¹、‘ポールスター’は0~76.3 mg g⁻¹で推移しており、その蓄積量は鱗茎のおおよそ4分の1程度であった。定植日である4月27日の葉身では、フルクタンを検出できなかったが、定植直後の5月12日の葉身では、鱗茎と同様にフルクタン含量が両品種とも急増した。その後、5月26日から減少していき、7月7日以降はフルクタンが全く検出されなかった。

葉身でフルクタンが検出できた5月12日から6月23日までの組成別フルクタンの含量の推移を第12図に示した。5月12日の葉身では、‘北もみじ 2000’がDP3~8のフルクタンを蓄積していたのに対して、‘ポールスター’はDP3~10のフルクタンを蓄積していた。5月26日以降は、重合度の高いフルクタンが徐々に減少し、フルクタンが最後に検出できた6月23日の葉身では、‘北もみじ 2000’がDP3~5、‘ポールスター’がDP3~6のフルクタンを蓄積していた。‘ポールスター’が‘北もみじ 2000’よりもDPが高いフルクタンを多く蓄積する傾向は鱗茎に比べて葉身の方が顕著であるようであった。

鱗茎および葉身ともに、生育初期に一時的にフルクタンが高く蓄積するという傾向がみられた。これは、ネギ(*Allium fistulosum*)の葉身部におけるフルクタン含量の変化と傾向が似ていた(Hang et al., 2004; Yaguchi et al., 2008)。このことから、定植直後にフルクタンが一時的に増加することは、ネギ属植物で一般的な現象なのかもしれない。例えば、定植後に起こる葉身の分げつを促進するエネルギー源として必要である可能性などが考えられる。また、一時的にフルクタンが増加していた時期の葉鞘基部は、まだいわゆる鱗茎として肥大する時期でないにもかかわらずやや肥大がみられた(第6, 7図)。温室で育苗していた苗を圃場へ移植しているが、この際に断根によるダメージや低温外気にさらされるストレスがかかると予想され、これらのことがこの生育初期の一時的な肥大に関わる可能性も考えられる。タマネギの鱗茎肥大は、生理学的には日長や気温などの外的な環境要因に関わるが、その他に、オーキシシンやジベレリンのような植物ホルモンの増減、内在リノレン酸の変化などの内的要因が影響していると考え

られている(加藤, 1999; 斎藤ら, 2006)。また、鱗茎肥大そのものがフルクタン蓄積に影響している可能性も考えられ、この時期の一時的なフルクタン蓄積とも関わることも考えられる。

これまでの先行研究では、鱗茎に含まれるフルクタンの組成と含量の品種間差は報告されていたが(Shiomi et al., 1997; Maeda et al., 2017)、生育期間全体で評価した例はなかった。また多くの研究において、葉身を分析した例はない。鱗茎肥大が開始すると、鱗茎のフルクタン含量は増加するのに対し、葉身のフルクタンは検出されなくなった。これは、葉身に蓄積していたフルクタンは鱗茎肥大のために地下部へ転流されたと考えられる。コムギの場合、開花後10～20 日後にフルクタン含量がピークを迎える傾向があり(Xu et al., 2016)、また、穀粒発達ステージの早期に高重合度のフルクタンが蓄積することが穀粒へのデンプン蓄積を担うスクロース源として重要な役割を果たしているという報告もある(Cimini et al., 2015)。このことから、フルクタンを蓄積するには、葉身および鱗茎中にスクロースが一定量以上蓄積することが、鱗茎肥大およびフルクタンの蓄積に影響を与えているのかもしれない。今回の研究では、葉身組織ではフルクタン含量や組成の推移にのみ着目したので、今後は葉身内で働くフルクタン合成・分解酵素の活性やフルクタン代謝や糖代謝に関わる遺伝子発現にも着目し、タマネギの植物体全体における糖代謝の挙動を把握する必要があると考える。

IV. 鱗茎から抽出した粗酵素によるフルクタン代謝酵素活性

生育期間全体における‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’鱗茎中のフルクタン合成・分解酵素活性の推移を第 13 図に示した。フルクタン合成酵素の 1-SST、6G-FFT、1-FFT の活性は、両品種とも同様に推移する傾向を示していた。定植後の 5 月 12 日に一時的に増加した後、活性は 6 月にかけて減少し、その後はほぼ横ばいもしくは若干減少する傾向であった。8 月の収穫時期では、‘ポールスター’の 6G-FFT と 1-FFT の活性が‘北もみじ 2000’よりも有意に高かった。しかし、この時期の‘ポールスター’の鱗茎フルクタン含量は‘北もみじ 2000’よりも有意に低く(第 8 図)、『ポールスター』では酵素活性の高まりとは反対にフルクタンを蓄積できなかったと考えられる。

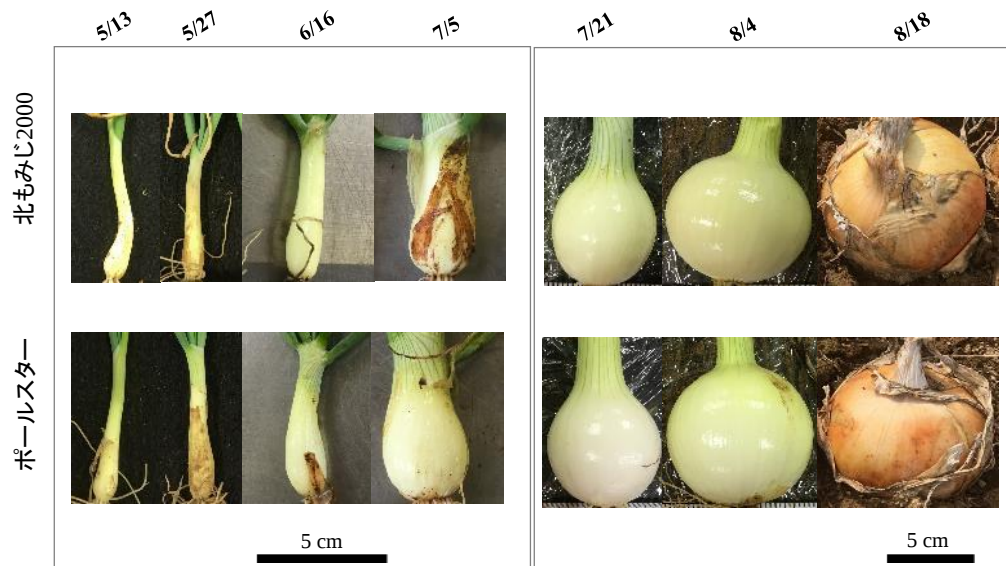
フルクタン分解酵素の 1-FEH の活性は、両品種とも 5 月 26 日から 6 月にかけて増加した。その後、収穫まで減少していたが、この活性の推移はこの時期に鱗茎フルクタン含量が減少する傾向とおおよそ一致していた(第 8 図, 第 13 図)。INV 活性は、1-FEH 活性と同様に 6 月に増加し、『ポールスター』の INV 活性が‘北もみじ 2000’よりも有意に高かった。

生育期間全体における鱗茎中のフルクタン合成・分解酵素活性を‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’で比較すると、両品種とも同様のタイミングで増減して似たような推移傾向を示していた。

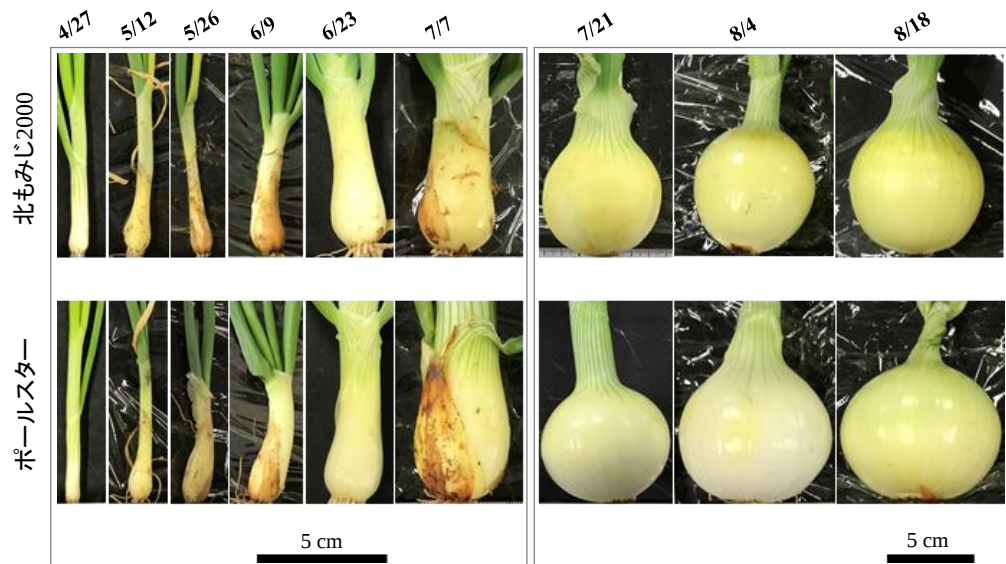
生育時期ごとに2品種の活性の違いをみると、‘北もみじ 2000’よりも‘ポールスター’において、生育後期のフルクタン合成酵素活性が高かった。しかし、‘ポールスター’は鱗茎に多くのフルクタンを蓄積できていなかったことから、鱗茎のフルクタン蓄積は、合成酵素活性よりも、鱗茎形成過程におけるフルクタン分解活性が大きく関係しているのではないかと考えられる。一方、フルクタン合成において、はじめに必要となる基質であるスクロースが‘ポールスター’では十分量蓄積していなかったことが、フルクタン含量にも影響を与えていた可能性も考えられる。オオムギの場合、スクロース蓄積量の違いがデンプン合成やフルクタン合成を制御することが報告されている(Jin et al. 2017)。また、スクローストランスポーターの発現が鱗茎肥大に関係しているとタマネギ鱗茎のトランスクリプトーム解析の結果からも報告されている(Zhang et al. 2016)。さらに、近年では、チコリーやパンコムギの場合、R2R3-MYB 転写因子がフルクタン合成・分解の調節に関わっている報告もされている(Wei et al., 2017; Kooiker et al 2013)。したがって、タマネギのフルクタン代謝のメカニズムをさらに詳細に調査するには、フルクタンの合成・分解酵素だけでなく、スクロースの蓄積やスクロース代謝関連遺伝子および MYB 転写因子についても着目して調べる必要があると考えられる。

本研究では、鱗茎における酵素活性解析は粗酵素を用いて行った。粗酵素は組織から比較的簡便な方法で抽出して、溶液中の目的酵素の活性を容易に評価できる。一方、全タンパク質である粗酵素には色々な酵素類や基質類の共存があるため、各酵素の反応速度などの酵素特異的な解析は行えない。コムギやリュウゼツランでは、フルクタン合成酵素の 1-SST、6G-FFT、1-FFT に関わる遺伝子が 2 つずつ発見されており(Kawakami and Yoshida, 2005; Cortés-Romero et al., 2012)、キクイモでは、1-FEH に関わる遺伝子は少なくとも 2 つ以上あり、遺伝子によってキクイモの茎葉部分に働くものと萌芽期に働くものと作用機序が異なっていると報告されている(Xu et al., 2015)。今後、タマネギにおけるフルクタン合成・分解酵素活性をより詳細に評価するためには、植物組織から精製した酵素や異宿主発現系による組換え酵素等を用いて評価することが必要である。そのような実験を通じて、鱗茎に蓄積するフルクタンの重合度に影響を与える特異的な酵素や遺伝子を解明できるものと考えられる。

A:2016年



B:2017年

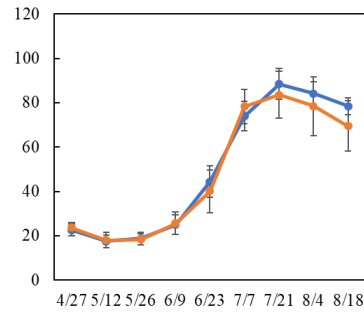
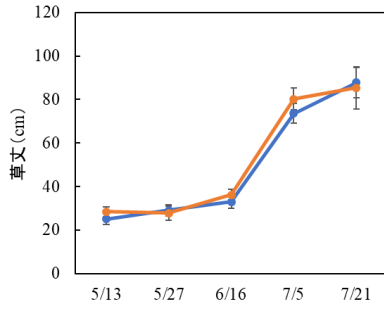


第6図 経時的に採取したタマネギ鱗茎
A:2016年採取, B:2017年採取

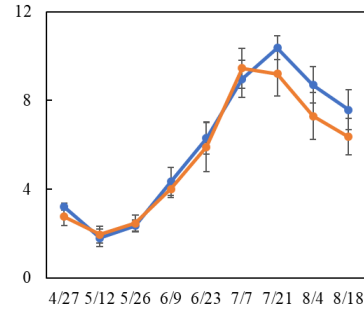
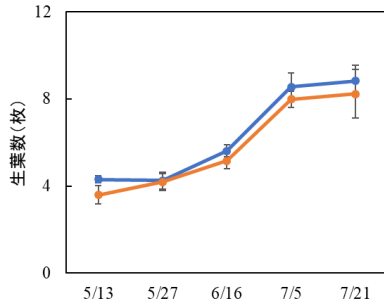
2016年

2017年

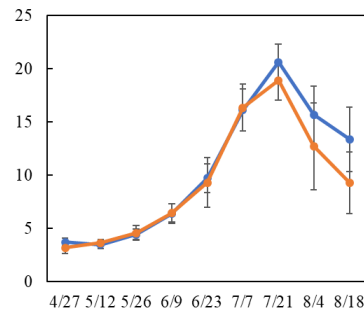
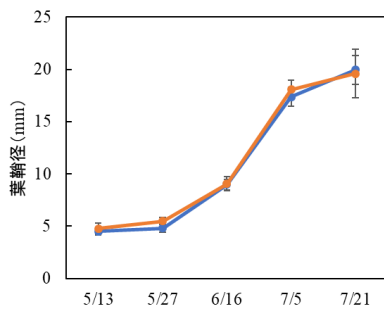
草丈



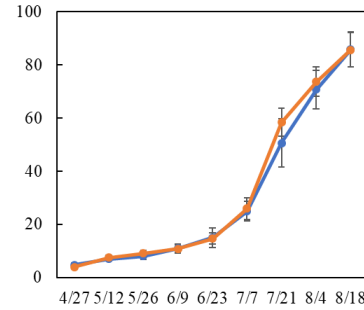
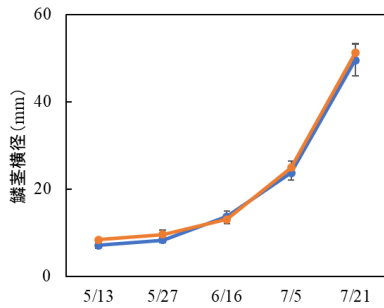
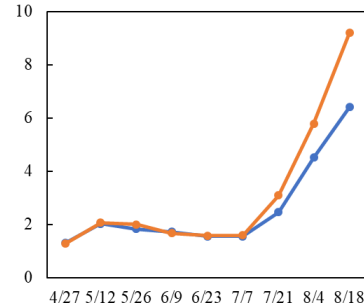
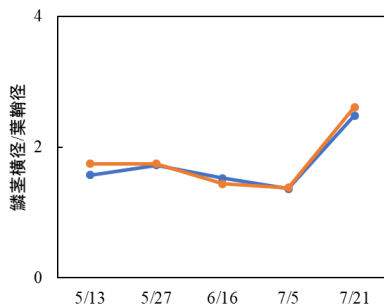
生葉数



葉鞘径



鱗茎横径

鱗茎横径/
葉鞘径

第7図 タマネギの生育に伴う地上部の諸形質の推移。
 (草丈・生葉数・葉鞘径・鱗茎横径・鱗茎横径/葉鞘径)
 図中の縦棒は標準誤差を示す($n = 15 \sim 20$)。

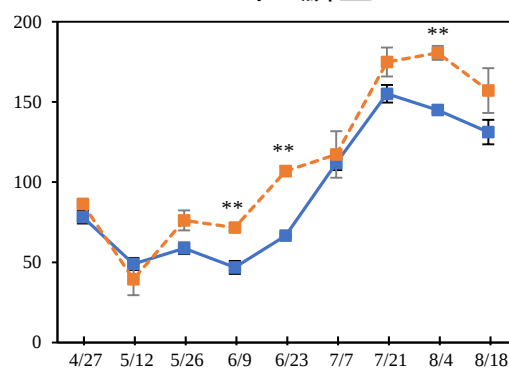
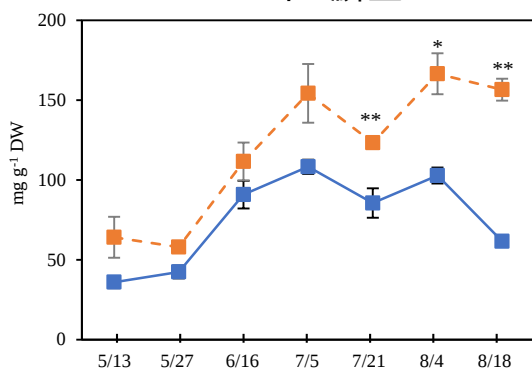
北もみじ2000

ポールスター

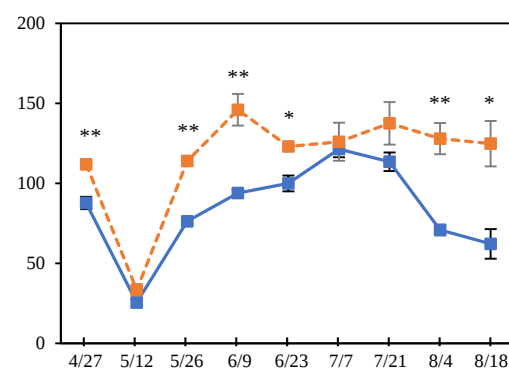
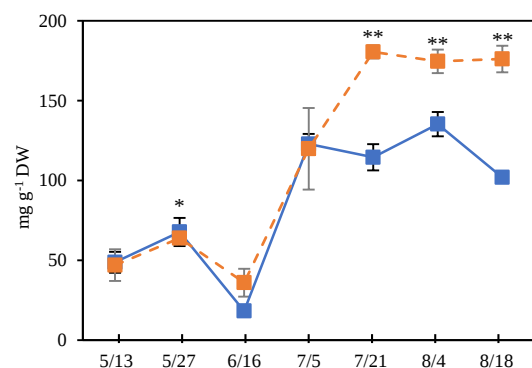
2016年 鱗茎

2017年 鱗茎

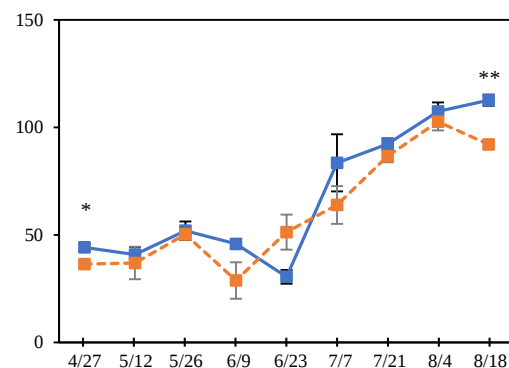
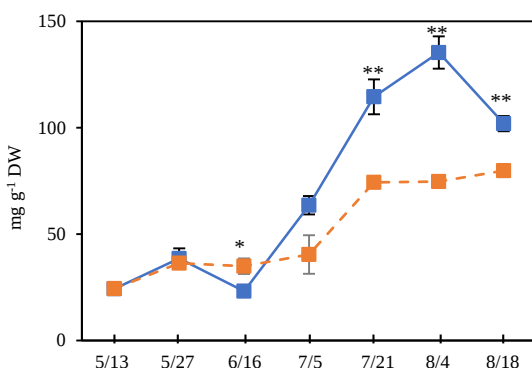
グルコース



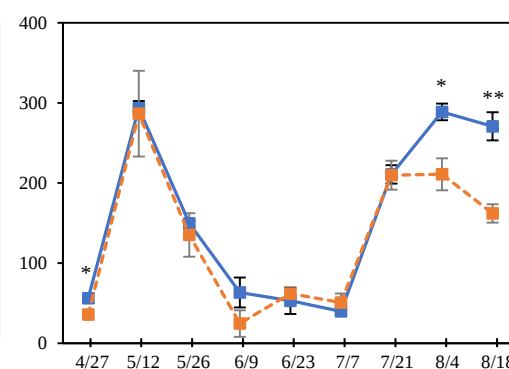
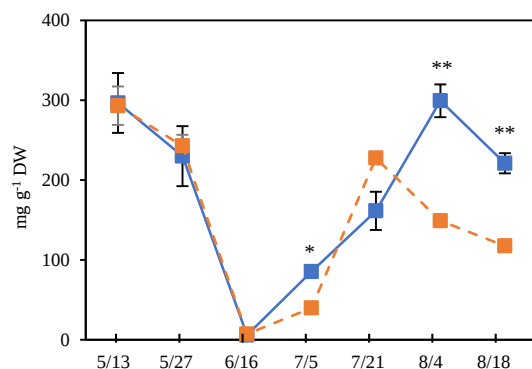
フルクトース



スクロース



フルクタン



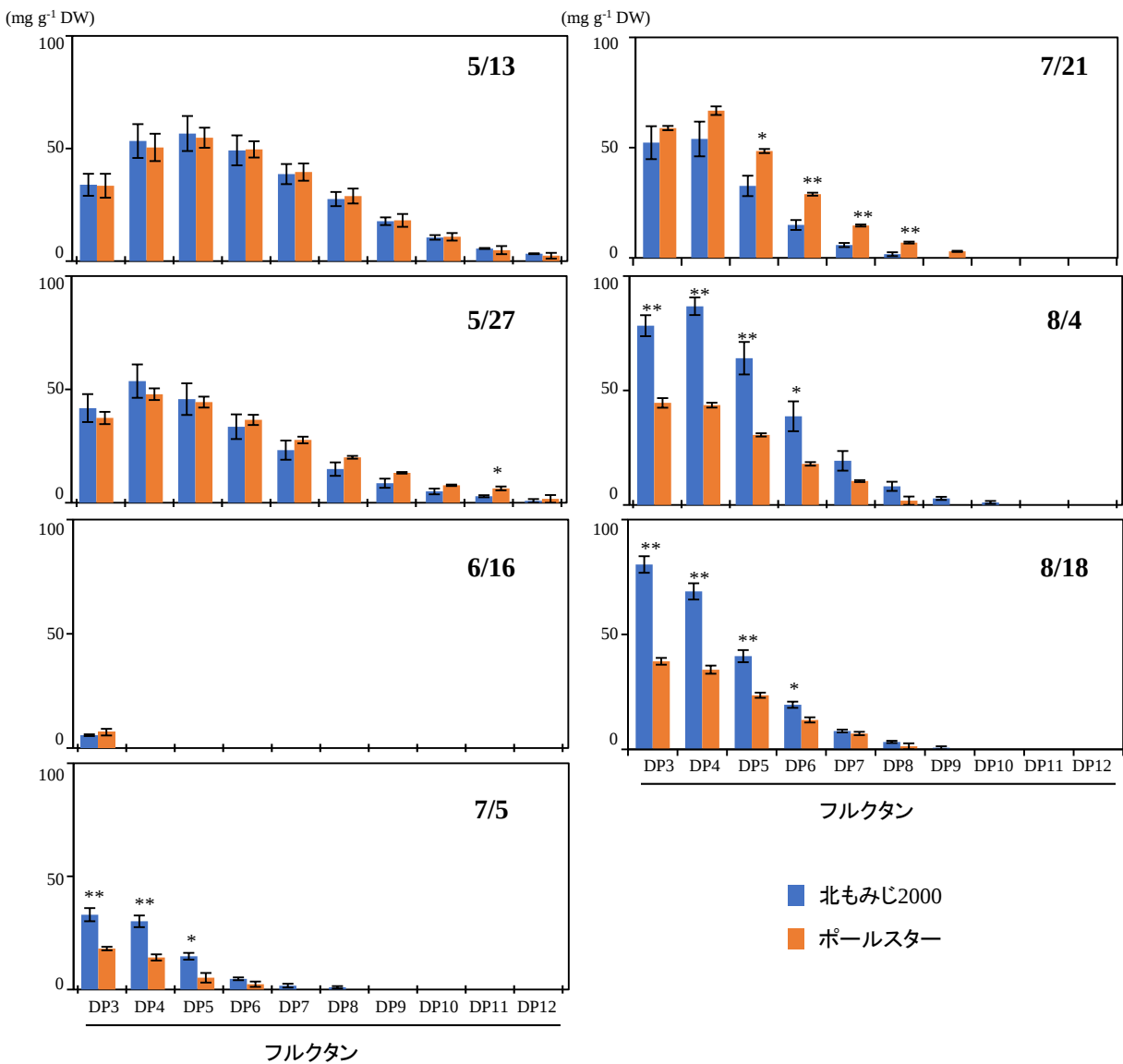
第8図 タマネギ鱗茎におけるフルクトース・グルコース・スクロースおよびフルクタン含量の生育に伴う推移。

*, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり。

図中の縦棒は標準誤差を示す ($n = 3$)。

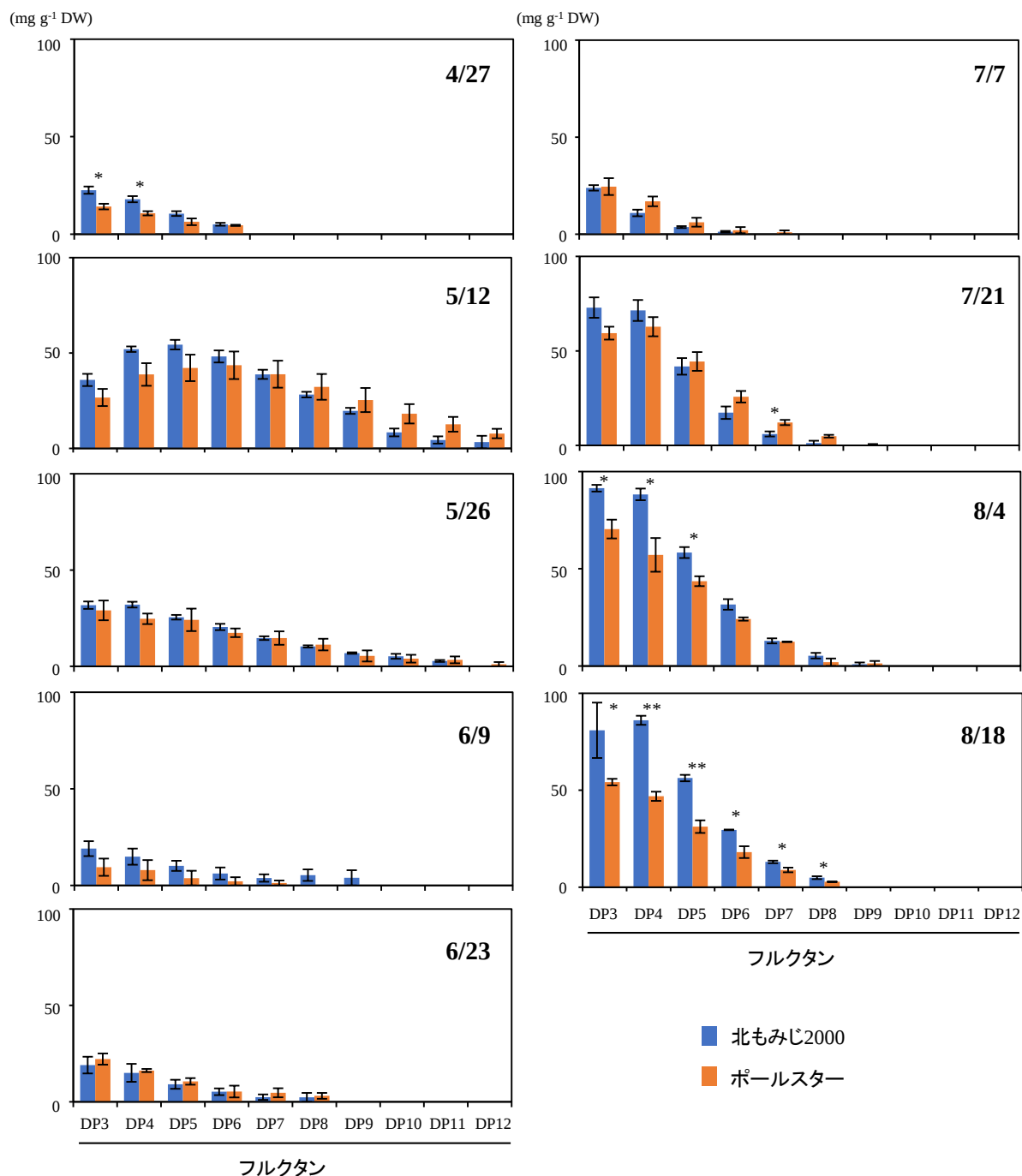
—■— 北もみじ2000 - - ■ - - ポールスター

2016年 鱗茎



第9図 タマネギ鱗茎における重合度別フルクタン含量の生育に伴う推移(2016年).
 *, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり。
 図中の縦棒は標準誤差を示す (n = 3).

2017年 鱗茎

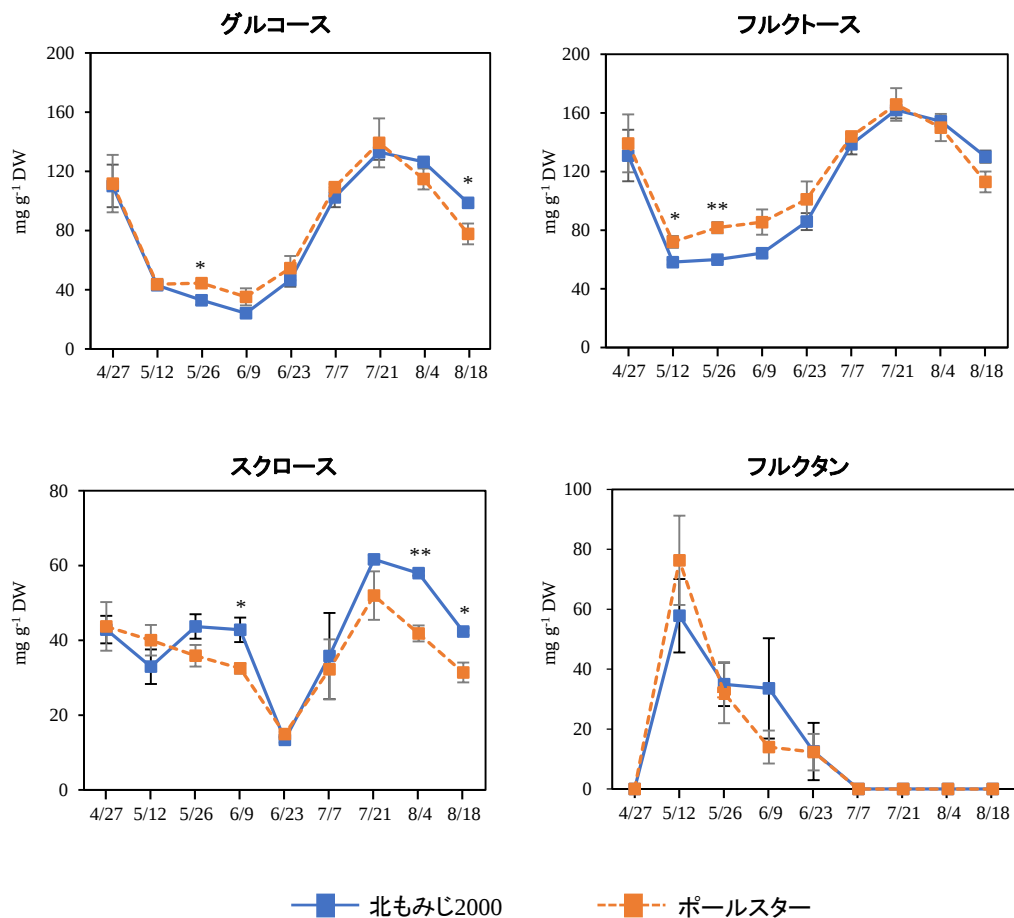


第10図 タマネギ鱗茎における重合度別フルクタン含量の生育に伴う推移(2017年).

*, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり.

図中の縦棒は標準誤差を示す($n = 3$).

2017年 葉身

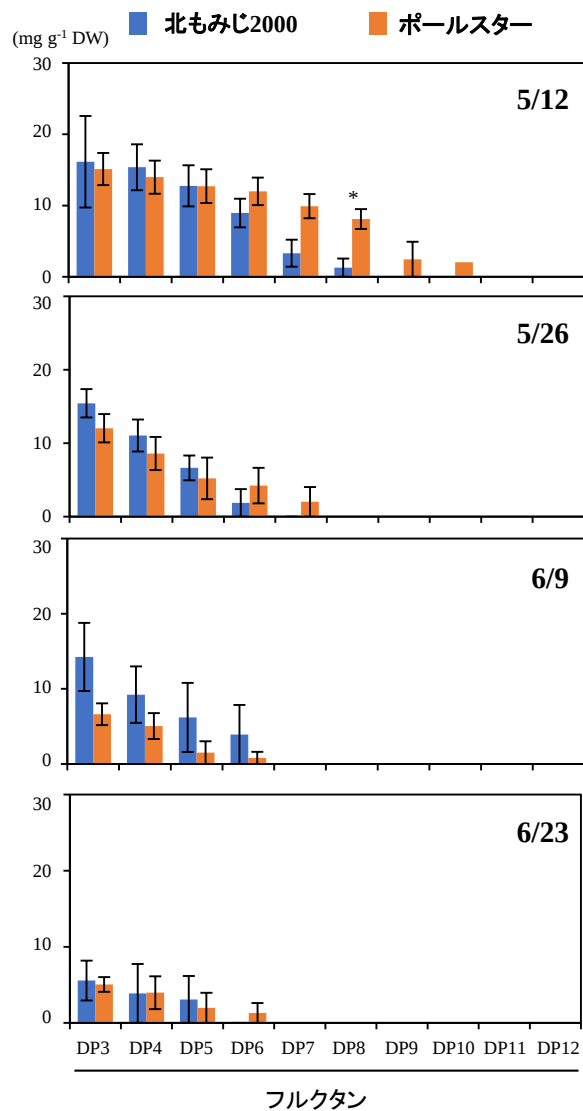


第11図 タマネギ葉身におけるフルクトース・グルコース・スクロースおよびフルクタン含量の生育に伴う推移(2017年)。

*, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり。

図中の縦棒は標準誤差を示す($n = 3$)。

2017年 葉身

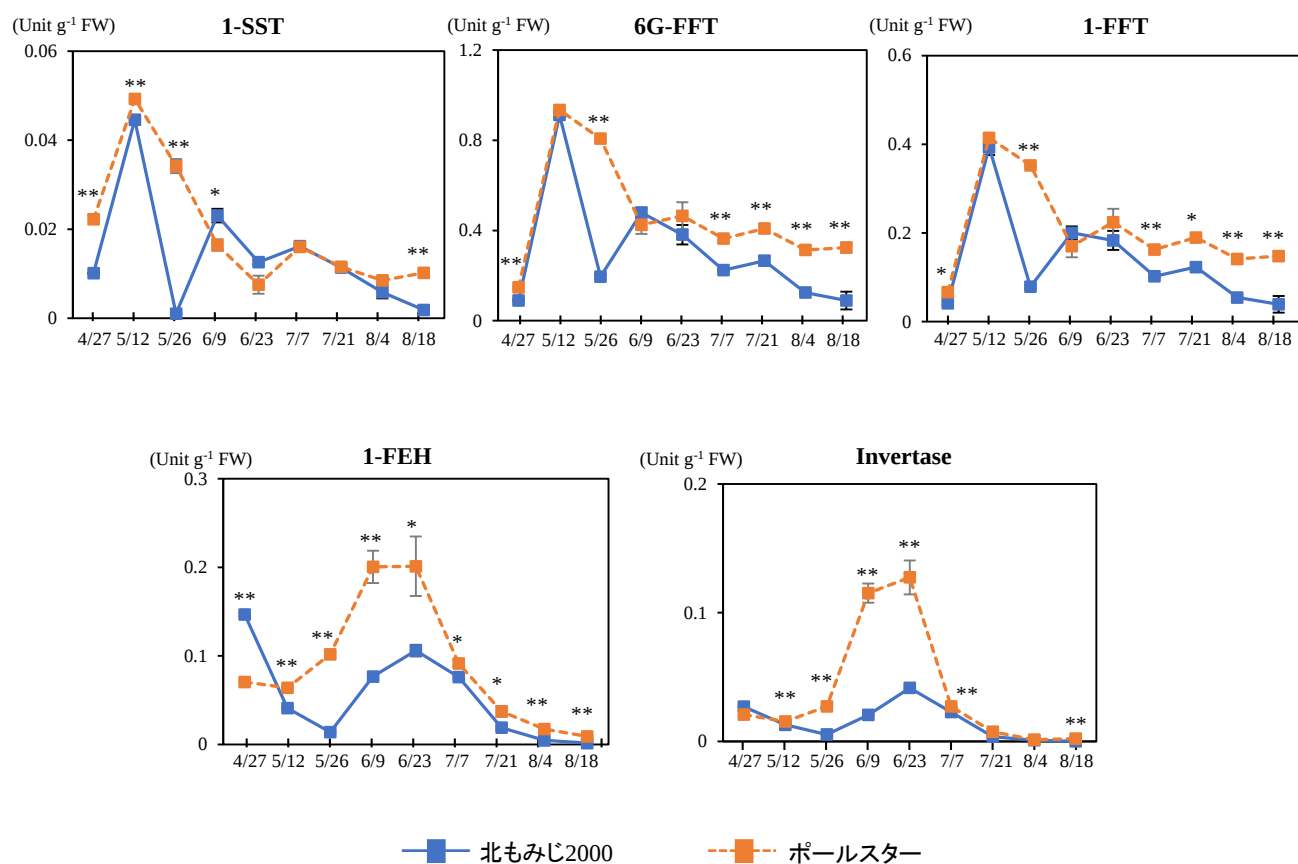


第12図 タマネギ葉身における重合度別フルクタン含量の生育に伴う推移(2017年).

*, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり.

図中の縦棒は標準誤差を示す($n = 3$).

2017年 鱗茎



第13図 タマネギ鱗茎の粗酵素を用いたフルクタン合成・分解酵素活性の生育に伴う推移(2017年).

*, **は、t検定によりそれぞれ5%, 1%水準で品種間に有意差あり。
 図中の縦棒は標準誤差を示す($n=3$)

第3章 タマネギにおけるフルクタン代謝酵素遺伝子の同定と機能解析

タマネギが含まれるネギ属植物やアスパラガスは、イヌリンタイプとイヌリンネオシリーズのフルクタンを蓄積する(Shiomi, 1989; Baumgartner et al., 2000; Fujishima et al., 2005)。これらのフルクタンの蓄積と分解には、フルクタン合成酵素(1-SST、6G-FFT、1-FFT)とフルクタン分解酵素(1-FEH)が関わっている。これまでタマネギでは、1-SST や 6G-FFT、インベルターゼの遺伝子が粗酵素や組換え酵素を使って解析され、すでに単離・同定されている(Shiomi 1989; Vijn et al., 1997; Vijn et al., 1998)。1-FFT は、単離・同定はされていないものの、タマネギから抽出した精製酵素の活性解析により、6G-FFT が 1-FFT 活性も持っていることが報告されている(Fujishima et al., 2005)。一方、1-FEH はコムギやチコリーなどの作物ではすでに単離されているが(Van den Ende et al., 2001, 2003)、タマネギの 1-FEH は単離・同定がなされておらず、フルクタン蓄積の動態を合成および分解の両面から追跡することができていなかった。1-SST および 6G-FFT 遺伝子は、‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’(LC121829)を筆者の修士論文でクローニングしている(奥, 2016)。本章では、タマネギから 1-FEH 候補遺伝子を新たにクローニングし、タバコプロトプラスト過発現系を用いて 1-FEH の活性評価を行った。

第1節 材料および方法

(1)植物材料

タマネギ

‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’の鱗茎組織を用いた。2014 年 2 月中旬に弘前大学農学生命科学部の温室内(22℃)に播種して育苗を行った。2014 年 4 月下旬に北海道大学北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究圃場に定植し、2014 年 8 月上旬に収穫を行った。収穫後、茎盤部分を含む鱗茎組織を剃刀で切り取ったものを 1.5 mL チューブに入れ、液体窒素中で凍結させてから、使用するまで-80℃で保存した。

Nicotiana benthamiana

16 時間日長、24℃、相対湿度 50%の植物育成室で育成。プロトプラスト作製には、移植後約 1 ヶ月後の葉(横幅が 6~7 cm 程度)を使用した。

(2)全核酸抽出(フェノールクロロホルム法)

鱗茎組織 0.1 g を冷やした乳鉢と乳棒を用いて液体窒素中で磨砕し、磨砕した組織を 500 μ L TE 飽和フェノール(ニッポンジーン)と 500 μ L 核酸抽出緩衝液(第 1 表)を加えた 1.5 mL チューブに加え、30 秒間ボルテックスした。室温で遠心分離(12,000 rpm, 3 分)した後、約 400 μ L の上清を新しい 1.5 mL に回収し、上清の半分量の TE 飽和フェノールと半分量のクロロホルム(富士フィルム和光純薬工業)をそれぞれ加え、30 秒間ボルテックスし、室温で遠心

分離した(14,000 rpm, 5 分)。遠心後、水層部分の上清を回収し、フェノール層と水層の間にある白いタンパク質が含まれる中間層がなくなるまでフェノールクロロホルム抽出を同様に行い、有機物やタンパク質を十分に除去した。その後、回収した水層に 1/10 量の 3 M の酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 3 倍量の冷エタノールを加え、転倒混和し、4℃で遠心分離した(14,000 rpm, 10 分)。上清を除去後、沈殿したペレットを洗浄するために、500 μ L の 70%冷エタノールを加え、4℃で遠心分離した(14,000 rpm, 5 分)。遠心後、上清を十分に除去し、ペレットに 30 μ L の水を加えて氷上で溶解したものを全核酸抽出物として用いた。

(3) DNase 処理および cDNA 合成

全核酸に含まれる gDNA を除去するために、TURBO DNase (Ambion)を用いて、第 2 表で示すように全核酸と試薬を調整後、37℃で 30 分間 DNase 処理を行った。DNase 処理後、50 μ L の水、50 μ L の酸性フェノール(ニッポンジーン)、50 μ L のクロロホルムを加え、30 秒間ボルテックスし、室温で遠心分離した(14,000 rpm, 5 分)。100 μ L の上清を新しい 1.5 mL チューブに入れて、等量のクロロホルムを加え、30 秒間ボルテックスし、室温で遠心分離した(14,000 rpm, 5 分)。遠心後は、100 μ L の上清に、1/10 量の 3 M の酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 2.2 倍量の冷エタノールを加えて転倒混和した後、-30℃で一晩置いてエタノール沈殿を行った。エタノール沈殿後、4℃で遠心分離した(14,000 rpm, 30 分)。上清を除去後、沈殿したペレットを洗浄するために、500 μ L の 70%冷エタノールを加え、4℃で遠心分離した(14,000 rpm, 5 分)。遠心後、上清を十分に除去し、ペレットに 7 μ L の水を加えて氷上で溶解したものを RNA 溶液として cDNA 合成に用いた。

cDNA 合成は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(東洋紡)を用いて行った、第 3 表で示すように RNA と試薬を調整後、サーマルサイクラー (Life Eco Ver2.0. Bioer Technology, Hangzhou, China)を用いて cDNA を合成した。

(4) フルクタン代謝酵素遺伝子のクローニング

フルクタン代謝に関わる遺伝子群の配列を参考にプライマー(第 4 表)を設計し、KOD - Plus- (東洋紡)を用いて第 5 表に示すように調整後 PCR を行った。目的サイズの増幅バンドが得られた場合には、10 $\times$ A-attachment Mix(東洋紡)を用いて、後に行う TA クローニング用に平滑末端になっている 3'末端に dA を付加した。Agarose S(ニッポンジーン)と 1 $\times$ TBE 緩衝液、5 mg mL⁻¹のエチジウムブロマイド(Invitrogen)で作製した 1.2%アガロースゲルを用いて、得られた PCR 産物を電気泳動し、QIAEX II Gel Extraction Kit(QIAGEN)を取扱説明書に従って用いて PCR 産物の抽出と精製を行った。

切り出した PCR 産物は取扱説明書に従って pGEM-T Easy ベクター(プロメガ)へライゲーションした。ライゲーション産物を *E. coli* JM109 コンピテントセル(タカラバイオ)に加え、42℃のウォーターバスで 45 秒間ヒートショックを与えた後、氷上で 2 分間急冷した。その後、450 μ L の 2YT 液体培地を加え転倒混和し、37℃で 30 分間インキュベートした後に、37℃で 30 分間

振とう培養して、大腸菌をリカバリーさせた。50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のアンピシリンを加えた LB プレートに、50 μL の 2% X-Gal、12 μL の 0.84 M IPTG、100 μL の大腸菌培養液をコンラージ棒で塗布した。塗布後、37°Cで一晩インキュベートした。

プラスミド DNA を増幅させるため、プレートにできたホワイトコロニーを爪楊枝でつつき、2 μL の 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ のアンピシリンと 1.4 mL の 2YT を加えた遠沈管の中に入れて、37°Cで 16 時間振とう培養し、大腸菌を増幅させた。プラスミド DNA の抽出と精製は、ISOSPIN Plasmid (ニッポンジーン) を取扱説明書に従って用いた。精製したプラスミド DNA は、NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で濃度を確認後、一部を制限酵素処理し、アガロースゲルを用いた電気泳動によりインサートされている DNA の長さが目的のものと一致するかを確認した。プラスミド DNA はシーケンス解析を行い、フルクタン代謝酵素遺伝子の部分配列の塩基情報を取得した。さらに部分配列の塩基情報から特異的プライマー(第 4 表)を作製し、RACE 法により cDNA の末端情報を取得した後に、全長配列を決定した。

(5) プロトプラスト発現ベクターの作製

タバコプロトプラストにおけるフルクタン代謝酵素の一過発現は、フルクタン代謝酵素遺伝子を組み込んだ pE2113 ベクターを細胞へトランスフェクションすることにより行った。pE2113 ベクターは、35S プロモーターを持つ pBI221 を改変したベクターである (Mitsuhara et al., 1996)。pE2113 ベクターの GUS 部分を制限酵素 (XbaI と SacI または SmaI と SacI) で切断し、その部分に目的遺伝子を入れて作製した。蛍光観察により遺伝子発現部位が確認できるように、9132 の C 端側には蛍光タンパク質の DsRed 遺伝子を付加して作成した。また、6G-FFT には C 端側に FLAG タグを付加して作成した。設計する際に用いたプライマーは、第 6 表に示した。

① pE2113:9132-DsRed の作製

Onion9132 は遺伝子配列内に SacI 配列があるため、本来の配列では pE2113 ベクターの SacI サイトに導入できない。そこで、アミノ酸変異を伴わないように SacI 配列を変異させたクローンを別に用意して以後のクローニングに用いた。SacI を変異させた Onion9132 を鋳型に用いて、fusion PCR により C 端側に DsRed 配列を付加した。DsRed とのリンカー部分には、Gly-Gly-Gly-Ser の 3 回繰り返し配列 (36 塩基、12 アミノ酸) を挿入した。得られた PCR 産物は pGEM-T Easy vector にクローニングして塩基配列の確認を行った。

pGEM:Onion9132DsRed (1 μg) は SpeI と SacI、pE2113:GUS (1 μg) は XbaI と SacI で処理し、電気泳動により Onion9132DsRed 部分、pE2113 ベクター部分を分離して目的バンドを抽出した。それぞれのゲル抽物はひとまとめにしてエタノール沈殿を行い、5 μL の Milli-Q に再溶した。5 μL の Mighty mix (タカラバイオ) を加えて 16°C、1 時間でライゲーションを行い、ライゲーション産物の全量を *E. coli* JM109 コンピテントセルに加えて形質転換した。得られたコロニーからプラスミドを抽出し、適切な配列を保持したクローンを選抜した。プロトプラストへの導

入のために、選抜されたプラスミドは、形質転換させた大腸菌コロニーを $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ でアンピシリンを加えた 10 mL の 2YT でさらに培養して実験に必要な量のプラスミドを抽出した。

②pE2113:6GFFT-FLAG の作製

すでにクローニングされていた pGEM:6G-FFT プラスミドを用いて、fusion PCR により 6G-FFT の C 端側に FLAG 配列を付加した。得られた PCR 産物は pGEM にクローニングして (pGEM:6GFFT-FLAG)、配列が正しいことを確認したクローンを選抜した。pGEM:6GFFT-FLAG と pE2113:GUS は各 $1 \mu\text{g}$ ずつ SmaI と SacI で処理し、それぞれ 6G-FFT FLAG 部分、pE2113 ベクター部分をゲルから抽出精製した。pE2113:9132-DsRed の作製と同様に、形質転換およびプラスミド抽出を行い、pE2113:6GFFT-FLAG を作製した。

(6) プロトプラスト調製およびトランスフェクション

プロトプラストの調製は、Vijn et al. (1997) および Yoo et al. (2007) を参考にして行った。*N. benthamiana* の葉を流水で洗浄し、水気をふき取った後、葉の裏表皮を取り除いた。シャーレに酵素液 (2% セルラーゼ RS (ヤクルト薬品工業), 0.5% マセロザイム R10 (ヤクルト薬品工業), 0.5 M マンニトール (富士フィルム和光純薬工業)) を約 20 mL 入れ、葉肉細胞を下にして酵素液に浸漬し、室温 5 時間程度暗所で静置した。プロトプラストを含む酵素液は二重にしたガーゼを通して表皮や維管束などを除去し、ろ液を 50 mL チューブに入れ、室温で遠心分離した (300 rpm, 2 分)。上清を除去後、15 mL の 0.4 M の冷マンニトール液を加え、やさしく懸濁し、室温で遠心分離した (300 rpm, 2 分)。この過程を繰り返した後、20 mL の 0.4 M の冷マンニトール液を加え、やさしく懸濁した後に氷上で 30 分以上静置した。室温で遠心分離 (300 rpm, 2 分) し、上清を除去後、適当なプロトプラスト濃度になるように冷 MMg solution (第 7 表) を加えて再懸濁した。

トランスフェクションは PEG 法を用いて行った。平底 1.5 mL チューブに目的のプラスミド $10 \mu\text{g}$ とプロトプラスト液 $200 \mu\text{L}$ 加え、プロトプラストが沈んで凝集しないうちに、 $250 \mu\text{L}$ PEG solution (第 8 表) を加え、やさしくピペッティングして混合した。PEG 処理後、 $800 \mu\text{L}$ の冷 W5 solution (第 9 表) を加え、転倒混和やタッピングで混和し 5 分間静置した。 4°C で遠心分離 (700 rpm, 2 分) し上清を除去後、最終濃度 $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ となるようにゲンタマイシンを添加したプロトプラスト培養液 (第 10 表) を 1 mL 加え転倒混和した後、 23°C で 20 時間暗所培養した。培養後、細胞の生死を確認するため FDA で蛍光染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(7) 粗酵素の抽出・精製および粗酵素反応

培養したプロトプラストを 4°C で遠心 (6,000 rpm, 2 分) し、上清をきれいに除去後、 $100 \sim 200 \mu\text{L}$ の 50 mM MES Buffer (pH 5.6) を加えて細胞を再懸濁した。懸濁液を氷上で冷やした乳鉢に移し、乳棒で磨砕して細胞を破壊し、新しい 1.5 mL チューブに回収したものを 4°C で遠心 ($13,000 \times g$, 5 分) することで細胞残渣を沈殿させた。遠心後、1.5 mL チューブに回収した上清

を粗酵素抽出液として用いた。

粗酵素抽出液は Sephadex G-25 Fine (GE Healthcare) を用いて低分子を除去 (すなわち脱塩) した。まず、Sephadex G-25 Fine を Milli-Q 水で膨潤させ、その後、50 mM MES Buffer (pH 5.6) で平衡化した。この際、担体に対して 10 倍程度のバッファーを加えよく混合させ、静置して担体を沈殿させてから上清を除き、新しいバッファーを加えるという作業を 3 回程度繰り返した。最終的に、担体が 2 倍希釈されるよう 50 mM MES Buffer を加え、担体が沈殿しないように混和しながら、先端に脱脂綿を詰めた 2.5 mL シリンジに 2 mL 加えた。シリンジは 15 mL チューブにセットした。4°C で遠心分離 (300×*g*, 1 分)、シリンジを新しい 15 mL チューブにセットし、約 200 μ L の粗酵素抽出液を担体に加えた。4°C で遠心分離 (300×*g*, 1 分) した後のろ液を新しい 1.5 mL チューブに回収し、これを粗酵素液として以後の酵素反応に用いた。プラスチックを導入していないプロトプラストからも同様に粗酵素液を抽出し、対照区として準備した。

粗酵素液に含まれるフルクタン合成酵素または分解酵素活性を以下のように測定した。粗酵素液を 50 mM MES Buffer (pH 5.6) で 5 倍希釈して 40 μ L とし、基質を 40 μ L を加えて 80 μ L の反応液を調製した。反応液を 27°C (温浴)、0.5、2、6、24 時間で反応させ、経時的に 20 μ L ずつ回収し、100°C で 3 分間処理することで酵素反応を停止させた。反応停止後、Milli-Q 水で希釈したものを分析試料として用いた。反応生成物は HPAEC-PAD により分析した。分析条件は第 2 章と同様の条件で行った。

第 2 節 結果および考察

I. Onion9132 (1-FEH) のクローニング

1-FEH 候補遺伝子をクローニングするため、アスパラガスなどの他植物のフルクタン代謝酵素遺伝子を参考に degenerate primer を作製した。PCR で得られた遺伝子部分配列をもとにさらに特異的プライマーを作製し、RACE 法により 3' 側と 5' 側の末端配列をクローニングし、ORF 全長を決定した。‘北もみじ 2000’では 1 クローン (9132_K1)、‘ポールスター’では 3 クローン (9132_P1, P2, P3) の 1-FEH 候補遺伝子の全長塩基配列を得た (第 14 図)。いずれのクローンも ORF 塩基配列は 1932 bp、644 個のアミノ酸で構成された (第 15 図)。Clustal W を用いて各クローン間の違いを比較したところ、9132_K1 と 9132_P1 は 100% 一致しており、この 2 つと 9132_P2 および 9132_P3 では、それぞれ 1 塩基が異なっていた。‘北もみじ 2000’の 9132_K1、‘ポールスター’の 9132_P1, P2 のアミノ酸配列に違いがみられなかったが、9132_P3 は、1 アミノ酸だけ違いがあった。これらの各アミノ酸には、インベルターゼやフルクタン合成酵素に保存されているモチーフである、EC モチーフ、RDP モチーフ、WMNDPNG モチーフ (Kawakami and Yoshida., 2005; Kawakami et al., 2005) が保存されていた (第 16~17 図)。また、アミノ酸配列で BLAST 検索にかけた結果、今回得られたクローンは、*Asparagus officinalis* (AAB71136.1) の酸性インベルターゼ、*Agave tequilana* (AFJ21575.1) の液胞インベルターゼ、

Allium cepa (CAA06839.1) のインベルターゼと高い相同性を示し、その相同性は、それぞれ、72%、71%、70%であった。

9132_K1、フルクタン合成酵素、分解酵素および酸性インベルターゼ（細胞壁インベルターゼ、液胞インベルターゼ）を用いて作成した系統樹を第 18 図に示した。系統解析の結果、フルクタン加水分解酵素と細胞壁インベルターゼから構成されるグループ、フルクタン合成酵素と液胞インベルターゼから構成されるグループの 2 つのグループに大別された。これまで植物で見つかっている FEH (1FEH、6FEH、1&6FEH、6G&1FEH) は細胞壁インベルターゼと同じクレードになった。一方、9132 K1 は、フルクタン合成酵素と液胞インベルターゼのグループに分かれた。

II. 9132 遺伝子の機能解析

タマネギからクローニングした 9132 遺伝子の機能を調べるために、9132 遺伝子をプロトプラストで一過発現させた。プロトプラストから抽出した粗タンパク質を用いて酵素反応を行い、どのような活性があるのかを評価した。

対照区として、プラスミドを導入していないプロトプラストから調製した粗酵素液を用いて行った反応生成物のクロマトグラムを第 19 図に示した。対照区では、若干ではあるが、スクロース、1-kestose、ネオkestose、1&6G-kestotetraose のすべての基質も分解産物が確認された。スクロースでは、フルクトースとグルコースが生成されており、1-kestose では、フルクトースとスクロースが生成され、反応 24 時間後では、スクロースの分解産物であるフルクトースとグルコースも確認できた。ネオkestose を基質した場合では、フルクトースとスクロースが生成されていた。1&6G-kestotetraose を基質とした場合では、大部分はフルクトースとネオkestose が生成されていたが、一部 1-kestose も生成されていた。この場合、1&6G-kestotetraose のフルクトース-フルクトース間の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合が分解されているが、一部、フルクトースとグルコース間の $\beta(2\rightarrow6)$ 結合も分解されていると予想される。Nagai et al., (2012) では、乾燥葉タバコのインベルターゼは、ラフィノース、スタキオース、1-kestose などのオリゴ糖の β -フルクトフラノシル残基（糖鎖のフルクトース残基）を認識し、加水分解する能力があるという報告がある。このことから、タバコ野生種である *N. benthamiana* の場合でもインベルターゼは、主にスクロースを加水分解するが、フルクタンに対しても低い加水分解活性を有していると考えられる。

pE2113:Onion9132 DsRed をプロトプラストに導入して得られた粗酵素液を用いた反応生成物のクロマトグラムを第 20 図に示した。基質がスクロースの場合では、基質が分解されてフルクトースとグルコースを生じたが、生成量は対照区と同程度であった。これは、ベンタミアナの内在性インベルターゼの働きで生じた分解産物であり、pE2113:Onion9132 DsRed にはスクロース分解活性はほとんど無いと考えられる。一方、基質が 1-kestose の場合では、基質は分解されてフルクトースとスクロースが生成し、またスクロース分解によるフルクトースもグルコースも生じていた。対照区と比較すると、1-kestose が分解される活性ははるかに高く、経時的に基質は減少して、反応 6 時間後には大半が分解され、24 時間後にはほとんど無くなっていた。

このことから、9132 は 1-FEH 活性を有していることが分かった。基質がネオケストースの場合では、基質が分解されてフルクトースとスクロースが生成され、さらにスクロース分解によるフルクトースとグルコースも生じていた。ネオケストースの分解速度は対照区に比べて速く、24 時間後の基質量は半分以上減少していた。基質を 1&6G-kestotetraose とした場合では、基質の分解産物であるフルクトースと 1-ケストースもしくはネオケストースが生じていた。処理 6 時間後には 1&6G-kestotetraose はほぼなくなり、1-ケストースおよびネオケストース、さらにその分解産であるフルクトースとスクロースが生じていた。1&6G-kestotetraose の分解産物として生じたものはネオケストースの方が 1-ケストースよりも高いピークだった。これらのことから、9132 はフルクトース-フルクトース間の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合を分解する 1-FEH 活性だけでなく、フルクトース-グルコース間の $\beta(2\rightarrow6)$ 結合も切断し分解する 6G&1-FEH 活性を持つことが分かった。つまり、Onion9132 は、最近報告されたアスパラガスの 6G&1-FEH(Ueno et al., 2005)と同等の能力があると考えられる。

pE2113:6GFFT-FLAG を導入して得られた粗酵素液を用いた反応生成物のクロマトグラムを第 21 図に示した。スクロースを基質とした場合では、新しく生成したフルクタンピークはなく、基質が分解されて生じたフルクトースとグルコースが検出された。これはプロトプラスト内在のインベルターゼによるものと考えられる。1-ケストースを基質とした場合では、新しくニストースのピークが検出された。また、反応時間の経過にともない、DP4 の 1&6G-kestotetraose、さらに DP5 と思われるフルクタンも合成されていた。反応 24 時間後には、転移反応で生じたネオケストースも大きなピークで検出された。この結果は、6G-FFT がグルコース 6 位炭素へのフルクトース転移反応だけでなく、フルクトース同士の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合を担う 1-FFT 様活性をもつという過去の報告とも一致していた(Fujishima et al., 2005)。ネオケストースを基質とした場合では、反応 24 時間後を除き、ほとんど変化が見られなかった。反応 24 時間後では、1-ケストースと 1&6G-kestotetraose が生じていた。この結果は、タマネギの 6G-FFT は、ネオケストースのフルクトース-グルコース間の $\beta(2\rightarrow6)$ 結合のフルクトースを $\beta(2\rightarrow1)$ 結合へ転移させる能力があって 1-ケストースや 1&6G-kestotetraose を生じる活性を持つことを示す。Shiomi (1982)および Ueno et al. (2005)によると、前述の反応がアスパラガスにはあると考えられている。1&6G-kestotetraose を基質とした場合では反応時間の経過にともない DP5 以上のフルクタンが合成されていた。同時に、1-ケストースもしくはネオケストースが増加していたことから、主に基質の 1&6G-kestotetraose のフルクトース-フルクトース間の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合を切って、他の 1&6G-kestotetraose の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合部分に転移して DP5 のフルクタンができていたのではないかと考えられる。

これまで、フルクタン代謝酵素遺伝子を用いて系統解析した研究では、FEH をはじめとするフルクタン分解酵素は細胞壁インベルターゼから進化したものであるとされ、一方、フルクタン合成酵素は液胞インベルターゼが進化したものであると考えられてきた。本研究で同定されたタマネギ 1-FEH である 9132 遺伝子はこれまでに報告がないはじめての液胞インベルターゼ様のフルクタン加水分解酵素であることが分かった。プロトプラストを用いた Onion9132 の機能

解析でも、9132 は基質の 1-ケストース、ネオケストース、1&6G-kestotetraose を分解し、フルクトースと分解産物を生成していたことから、フルクタン分解酵素であると考えられる(第 20 図)。特に、フルクタンのフルクトース-フルクトース間の $\beta(2\rightarrow1)$ 結合だけでなく、フルクトース-グルコース間の $\beta(2\rightarrow6)$ 結合も分解する活性が示されたことから、Onion9132 は 6G&1-FEH 活性を持ったフルクタン分解酵素であると考えられる。6G&1-FEH は、最近アスパラガスではじめて報告されたものである(Ueno et al., 2018)。しかし、アスパラガスの 6G&1-FEH とは異なり、Onion9132 はフルクタン合成酵素や液胞インベルターゼのグループに属していた。蛍光顕微鏡観察の結果では、pE2113:Onion9132DsRed を導入したプロトプラストは、核だけでなく液胞以外の細胞質と思われるところで蛍光発現が観察された(第 22 図)。系統樹の位置からは Onion9132 は液胞に局在すると予想されるが、蛍光観察では、Onion9132 の局在性ははっきり判別できなかった。今後は、共焦点顕微鏡を用いて Onion9132 の局在性を詳細にみる必要がある。

6G&1-FEH はタマネギやアスパラガスでのみ同定されたことになるが、リュウゼツランなどイヌリンネオシリーズのフルクタンを蓄積するユリ科植物(クロンキスト体系)でも 6G&1-FEH 活性をもつ酵素がある可能性がある。同じフルクタン分解酵素でも、遺伝子配列や機能が異なるアイソザイムが存在する作物もあることから、今後はタマネギでも Onion9132 遺伝子以外のクローンについても機能解析を行い、他の活性を有している遺伝子が存在するか調べる必要がある。6G-FFT はすでに単離・同定されその機能解析も行われていたが、本研究では、既報とは異なるタマネギ品種でも同様の結果を示すことができた。すなわち、既報で使われたタマネギ品種‘天心’(日本農林社)と同様に、‘北もみじ 2000’でも 6G-FFT が 1-FFT 活性も有していることが明らかになった(第 21 図)。アスパラガスの 6G-FFT の場合でも、6G-FFT 活性の 1/10 程度、1-FFT 活性があることが知られている(Shiomi and Ueno., 2004)。このことから、イヌリンネオシリーズのフルクタンを蓄積する植物がもつ 6G-FFT は、1-FFT 活性も併せ持つことが普遍的なことである可能性も考え得る。他の植物由来の遺伝子解析を行うなど、さらなる機能解析が求められる。

putative1-FEH_P1	ATGTCTTCTGTTAGAGACTTGGAGTGCCTCCCTTATCTTCCCTATCCCTCTCCTTTCT 60	putative1-FEH_P1	CTAGACTGGATCAAAATGCGACAAATCAACCCAGTATGCTTCCACACCTGGGTCGGT 720
putative1-FEH_P3	ATGTCTTCTGTTAGAGACTTGGAGTGCCTCCCTTATCTTCCCTATCCCTCTCCTTTCT 60	putative1-FEH_P3	CTAGACTGGATCAAAATGCGACAAATCAACCCAGTATGCTTCCACACCTGGGTCGGT 720
putative1-FEH_K1	ATGTCTTCTGTTAGAGACTTGGAGTGCCTCCCTTATCTTCCCTATCCCTCTCCTTTCT 60	putative1-FEH_K1	CTAGACTGGATCAAAATGCGACAAATCAACCCAGTATGCTTCCACACCTGGGTCGGT 720
putative1-FEH_P2	ATGTCTTCTGTTAGAGACTTGGAGTGCCTCCCTTATCTTCCCTATCCCTCTCCTTTCT 60	putative1-FEH_P2	CTAGACTGGATCAAAATGCGACAAATCAACCCAGTATGCTTCCACACCTGGGTCGGT 720

putative1-FEH_P1	CCGGAAGAAATCCGCTCCCGGCAAGCCAAAAAGGCATAGTTGTATCGGTGCTCTTATG 120	putative1-FEH_P1	GCTGACGACTTCAGAGACCCGACGACTGCATGGTTTGAACCCCTCGACATCCACATGGGCG 780
putative1-FEH_P3	CCGGAAGAAATCCGCTCCCGGCAAGCCAAAAAGGCATAGTTGTATCGGTGCTCTTATG 120	putative1-FEH_P3	GCTGACGACTTCAGAGACCCGACGACTGCATGGTTTGAACCCCTCGACATCCACATGGGCG 780
putative1-FEH_K1	CCGGAAGAAATCCGCTCCCGGCAAGCCAAAAAGGCATAGTTGTATCGGTGCTCTTATG 120	putative1-FEH_K1	GCTGACGACTTCAGAGACCCGACGACTGCATGGTTTGAACCCCTCGACATCCACATGGGCG 780
putative1-FEH_P2	CCGGAAGAAATCCGCTCCCGGCAAGCCAAAAAGGCATAGTTGTATCGGTGCTCTTATG 120	putative1-FEH_P2	GCTGACGACTTCAGAGACCCGACGACTGCATGGTTTGAACCCCTCGACATCCACATGGGCG 780

putative1-FEH_P1	CTTCTGATGCTTCAGGCTTGGCTGGTTCGTTTCGTTTCGGGTACGGATGAACGGGT 180	putative1-FEH_P1	GTACCCATTGGTTCAAAAGACGATCCAATAGCGGTATCGCTGTAGTGTACAGTACCAAG 840
putative1-FEH_P3	CTTCTGATGCTTCAGGCTTGGCTGGTTCGTTTCGTTTCGGGTACGGATGAACGGGT 180	putative1-FEH_P3	GTACCCATTGGTTCAAAAGACGATCCAATAGCGGTATCGCTGTAGTGTACAGTACCAAG 840
putative1-FEH_K1	CTTCTGATGCTTCAGGCTTGGCTGGTTCGTTTCGTTTCGGGTACGGATGAACGGGT 180	putative1-FEH_K1	GTACCCATTGGTTCAAAAGACGATCCAATAGCGGTATCGCTGTAGTGTACAGTACCAAG 840
putative1-FEH_P2	CTTCTGATGCTTCAGGCTTGGCTGGTTCGTTTCGTTTCGGGTACGGATGAACGGGT 180	putative1-FEH_P2	GTACCCATTGGTTCAAAAGACGATCCAATAGCGGTATCGCTGTAGTGTACAGTACCAAG 840

putative1-FEH_P1	TGGATCGATGCATCGGACCCGATCGTGGTGCATCGAGGTGTAAAGCGGAGTGTG 240	putative1-FEH_P1	GACTTCAAAACCTTCACGCTCCTTCCCAACACTTTACACGAGTTGCAAAAGTAGGTATG 900
putative1-FEH_P3	TGGATCGATGCATCGGACCCGATCGTGGTGCATCGAGGTGTAAAGCGGAGTGTG 240	putative1-FEH_P3	GACTTCAAAACCTTCACGCTCCTTCCCAACACTTTACACGAGTTGCAAAAGTAGGTATG 900
putative1-FEH_K1	TGGATCGATGCATCGGACCCGATCGTGGTGCATCGAGGTGTAAAGCGGAGTGTG 240	putative1-FEH_K1	GACTTCAAAACCTTCACGCTCCTTCCCAACACTTTACACGAGTTGCAAAAGTAGGTATG 900
putative1-FEH_P2	TGGATCGATGCATCGGACCCGATCGTGGTGCATCGAGGTGTAAAGCGGAGTGTG 240	putative1-FEH_P2	GACTTCAAAACCTTCACGCTCCTTCCCAACACTTTACACGAGTTGCAAAAGTAGGTATG 900

putative1-FEH_P1	ATGAAGGTTTCGGGTATAGGTACGGGTATGTTGAAAGTGGTTCGATCGGTGACTAAT 300	putative1-FEH_P1	TGGAGTGTATGATTTCTACCGATTTCACCGCTGTAGGCGGAAAGCAAAAGGCGCTG 960
putative1-FEH_P3	ATGAAGGTTTCGGGTATAGGTACGGGTATGTTGAAAGTGGTTCGATCGGTGACTAAT 300	putative1-FEH_P3	TGGAGTGTATGATTTCTACCGATTTCACCGCTGTAGGCGGAAAGCAAAAGGCGCTG 960
putative1-FEH_K1	ATGAAGGTTTCGGGTATAGGTACGGGTATGTTGAAAGTGGTTCGATCGGTGACTAAT 300	putative1-FEH_K1	TGGAGTGTATGATTTCTACCGATTTCACCGCTGTAGGCGGAAAGCAAAAGGCGCTG 960
putative1-FEH_P2	ATGAAGGTTTCGGGTATAGGTACGGGTATGTTGAAAGTGGTTCGATCGGTGACTAAT 300	putative1-FEH_P2	TGGAGTGTATGATTTCTACCGATTTCACCGCTGTAGGCGGAAAGCAAAAGGCGCTG 960

putative1-FEH_P1	CAGATGCTGTTGTGGCAGAGAAAGCGGTTTCATTTCAACCGAGAGAAATGGATGAAC 360	putative1-FEH_P1	GACCTGTCCGAAGGCCCGAGTTTGAACCAAAAGCATGTGCTTAAAGCTAGTACTTCTGAT 1020
putative1-FEH_P3	CAGATGCTGTTGTGGCAGAGAAAGCGGTTTCATTTCAACCGAGAGAAATGGATGAAC 360	putative1-FEH_P3	GACCTGTCCGAAGGCCCGAGTTTGAACCAAAAGCATGTGCTTAAAGCTAGTACTTCTGAT 1020
putative1-FEH_K1	CAGATGCTGTTGTGGCAGAGAAAGCGGTTTCATTTCAACCGAGAGAAATGGATGAAC 360	putative1-FEH_K1	GACCTGTCCGAAGGCCCGAGTTTGAACCAAAAGCATGTGCTTAAAGCTAGTACTTCTGAT 1020
putative1-FEH_P2	CAGATGCTGTTGTGGCAGAGAAAGCGGTTTCATTTCAACCGAGAGAAATGGATGAAC 360	putative1-FEH_P2	GACCTGTCCGAAGGCCCGAGTTTGAACCAAAAGCATGTGCTTAAAGCTAGTACTTCTGAT 1020

putative1-FEH_P1	GATCCGAATGGCCCAATGTATTACAATGGATGGTACCATTCTTCTACCAATACAACCGA 420	putative1-FEH_P1	AATGGGACGAGTACTATTCAATTGGGACTTATGACCTTAAGGCTAACACATGGGTTCCT 1080
putative1-FEH_P3	GATCCGAATGGCCCAATGTATTACAATGGATGGTACCATTCTTCTACCAATACAACCGA 420	putative1-FEH_P3	AATGGGACGAGTACTATTCAATTGGGACTTATGACCTTAAGGCTAACACATGGGTTCCT 1080
putative1-FEH_K1	GATCCGAATGGCCCAATGTATTACAATGGATGGTACCATTCTTCTACCAATACAACCGA 420	putative1-FEH_K1	AATGGGACGAGTACTATTCAATTGGGACTTATGACCTTAAGGCTAACACATGGGTTCCT 1080
putative1-FEH_P2	GATCCGAATGGCCCAATGTATTACAATGGATGGTACCATTCTTCTACCAATACAACCGA 420	putative1-FEH_P2	AATGGGACGAGTACTATTCAATTGGGACTTATGACCTTAAGGCTAACACATGGGTTCCT 1080

putative1-FEH_P1	GAAGCAGCAGTATGGGGAACATAGCGTGGGGCCACGAGGTGCAAAAGACCTTCTAAAC 480	putative1-FEH_P1	GACGTGGAGAGCCTTGATGTTGGTGTGGGTTGAGATATGACTGGGGAAGGTTTACGCT 1140
putative1-FEH_P3	GAAGCAGCAGTATGGGGAACATAGCGTGGGGCCACGAGGTGCAAAAGACCTTCTAAAC 480	putative1-FEH_P3	GACGTGGAGAGCCTTGATGTTGGTGTGGGTTGAGATATGACTGGGGAAGGTTTACGCT 1140
putative1-FEH_K1	GAAGCAGCAGTATGGGGAACATAGCGTGGGGCCACGAGGTGCAAAAGACCTTCTAAAC 480	putative1-FEH_K1	GACGTGGAGAGCCTTGATGTTGGTGTGGGTTGAGATATGACTGGGGAAGGTTTACGCT 1140
putative1-FEH_P2	GAAGCAGCAGTATGGGGAACATAGCGTGGGGCCACGAGGTGCAAAAGACCTTCTAAAC 480	putative1-FEH_P2	GACGTGGAGAGCCTTGATGTTGGTGTGGGTTGAGATATGACTGGGGAAGGTTTACGCT 1140

putative1-FEH_P1	TGGTCCACCTGCCCTTAGCCATGGTCCGACCGCTCTCTACGACGACAGGTTGCTGG 540	putative1-FEH_P1	TCTAAGACGTTTTATGATGAGGTTAAGCAAGAAAGGATTTTATGGGTTGGGTTAAGGAG 1200
putative1-FEH_P3	TGGTCCACCTGCCCTTAGCCATGGTCCGACCGCTCTCTACGACGACAGGTTGCTGG 540	putative1-FEH_P3	TCTAAGACGTTTTATGATGAGGTTAAGCAAGAAAGGATTTTATGGGTTGGGTTAAGGAG 1200
putative1-FEH_K1	TGGTCCACCTGCCCTTAGCCATGGTCCGACCGCTCTCTACGACGACAGGTTGCTGG 540	putative1-FEH_K1	TCTAAGACGTTTTATGATGAGGTTAAGCAAGAAAGGATTTTATGGGTTGGGTTAAGGAG 1200
putative1-FEH_P2	TGGTCCACCTGCCCTTAGCCATGGTCCGACCGCTCTCTACGACGACAGGTTGCTGG 540	putative1-FEH_P2	TCTAAGACGTTTTATGATGAGGTTAAGCAAGAAAGGATTTTATGGGTTGGGTTAAGGAG 1200

putative1-FEH_P1	ACTGGTTGAGCCACAATTTTACCAGATGGCGCATCATATGCTCTACACGGTCTCTTA 600	putative1-FEH_P1	GCCGATAGTGAGAGCACCGATGTTACCAAAAGGCTGGGCTCCCTTCAGGGAATTCCTCGA 1260
putative1-FEH_P3	ACTGGTTGAGCCACAATTTTACCAGATGGCGCATCATATGCTCTACACGGTCTCTTA 600	putative1-FEH_P3	GCCGATAGTGAGAGCACCGATGTTACCAAAAGGCTGGGCTCCCTTCAGGGAATTCCTCGA 1260
putative1-FEH_K1	ACTGGTTGAGCCACAATTTTACCAGATGGCGCATCATATGCTCTACACGGTCTCTTA 600	putative1-FEH_K1	GCCGATAGTGAGAGCACCGATGTTACCAAAAGGCTGGGCTCCCTTCAGGGAATTCCTCGA 1260
putative1-FEH_P2	ACTGGTTGAGCCACAATTTTACCAGATGGCGCATCATATGCTCTACACGGTCTCTTA 600	putative1-FEH_P2	GCCGATAGTGAGAGCACCGATGTTACCAAAAGGCTGGGCTCCCTTCAGGGAATTCCTCGA 1260

putative1-FEH_P1	AACGGCAGAGTTCAAGTTGAAAACATGCGAGTTCCAGCAAAATTTGTGCGATCCACTGCTG 660		
putative1-FEH_P3	AACGGCAGAGTTCAAGTTGAAAACATGCGAGTTCCAGCAAAATTTGTGCGATCCACTGCTG 660		
putative1-FEH_K1	AACGGCAGAGTTCAAGTTGAAAACATGCGAGTTCCAGCAAAATTTGTGCGATCCACTGCTG 660		
putative1-FEH_P2	AACGGCAGAGTTCAAGTTGAAAACATGCGAGTTCCAGCAAAATTTGTGCGATCCACTGCTG 660		

第14図 Onion9132遺伝子の塩基配列。
同一の塩基配列は*を付し、異なる部分は■で示す。

次のページへ続く

```

putative1-FEH_P1      ACAGTGTGTACGATTTGAACACGAAGACACACCTATTACATGCCCAGTAGAGGAGGTG 1320
putative1-FEH_P3      ACAGTGTGTACGATTTGAACACGAAGACACACCTATTACATGCCCAGTAGAGGAGGTG 1320
putative1-FEH_K1      ACAGTGTGTACGATTTGAACACGAAGACACACCTATTACATGCCCAGTAGAGGAGGTG 1320
putative1-FEH_P2      ACAGTGTGTACGATTTGAACACGAAGACACACCTATTACATGCCCAGTAGAGGAGGTG 1320
*****

putative1-FEH_P1      GAGAGTTTAAGAACAGAACACAGGGATTTGAGCGGAATTACAGTGGATGCTGGGAAAACT 1380
putative1-FEH_P3      GAGAGTTTAAGAACAGAACACAGGGATTTGAGCGGAATTACAGTGGATGCTGGGAAAACT 1380
putative1-FEH_K1      GAGAGTTTAAGAACAGAACACAGGGATTTGAGCGGAATTACAGTGGATGCTGGGAAAACT 1380
putative1-FEH_P2      GAGAGTTTAAGAACAGAACACAGGGATTTGAGCGGAATTACAGTGGATGCTGGGAAAACT 1380
*****

putative1-FEH_P1      ATGGAGCTCAATGTAGGTGGTGTGCACAGTTGGATGTTGAAGTTGAATTTACAATCGAG 1440
putative1-FEH_P3      ATGGAGCTCAATGTAGGTGGTGTGCACAGTTGGATGTTGAAGTTGAATTTACAATCGAG 1440
putative1-FEH_K1      ATGGAGCTCAATGTAGGTGGTGTGCACAGTTGGATGTTGAAGTTGAATTTACAATCGAG 1440
putative1-FEH_P2      ATGGAGCTCAATGTAGGTGGTGTGCACAGTTGGATGTTGAAGTTGAATTTACAATCGAG 1440
*****

putative1-FEH_P1      GAAAAGGCGTTAGAATTGGCGATTGAAGAAGACGTTGAGTATGAATGCAACACAAGTAGC 1500
putative1-FEH_P3      GAAAAGGCGTTAGAATTGGCGATTGAAGAAGACGTTGAGTATGAATGCAACACAAGTAGC 1500
putative1-FEH_K1      GAAAAGGCGTTAGAATTGGCGATTGAAGAAGACGTTGAGTATGAATGCAACACAAGTAGC 1500
putative1-FEH_P2      GAAAAGGCGTTAGAATTGGCGATTGAAGAAGACGTTGAGTATGAATGCAACACAAGTAGC 1500
*****

putative1-FEH_P1      GGTGCAGCAGACGCTGGACTGCTTGGACCGTTTGGATTGCTTGTGCTTGCCTAATGGGAT 1560
putative1-FEH_P3      GGTGCAGCAGACGCTGGACTGCTTGGACCGTTTGGATTGCTTGTGCTTGCCTAATGGGAT 1560
putative1-FEH_K1      GGTGCAGCAGACGCTGGACTGCTTGGACCGTTTGGATTGCTTGTGCTTGCCTAATGGGAT 1560
putative1-FEH_P2      GGTGCAGCAGACGCTGGACTGCTTGGACCGTTTGGATTGCTTGTGCTTGCCTAATGGGAT 1560
*****

putative1-FEH_P1      TTGACTGAACAGACTGCTACTTATTTCTATGTTAGCAAGAAATCAGACGCGAGTTTCGTT 1620
putative1-FEH_P3      TTGACTGAACAGACTGCTACTTATTTCTATGTTAGCAAGAAATCAGACGCGAGTTTCGTT 1620
putative1-FEH_K1      TTGACTGAACAGACTGCTACTTATTTCTATGTTAGCAAGAAATCAGACGCGAGTTTCGTT 1620
putative1-FEH_P2      TTGACTGAACAGACTGCTACTTATTTCTATGTTAGCAAGAAATCAGACGCGAGTTTCGTT 1620
*****

putative1-FEH_P1      ACTCATTTTGTCAAGATGAATTAAGATCTTCCAAAGCTAGTGACACTATTACTGAAATC 1680
putative1-FEH_P3      ACTCATTTTGTCAAGATGAATTAAGATCTTCCAAAGCTAGTGACACTATTACTGAAATC 1680
putative1-FEH_K1      ACTCATTTTGTCAAGATGAATTAAGATCTTCCAAAGCTAGTGACACTATTACTGAAATC 1680
putative1-FEH_P2      ACTCATTTTGTCAAGATGAATTAAGATCTTCCAAAGCTAGTGACACTATTACTGAAATC 1680
*****

putative1-FEH_P1      GTTGGGCATACCGTTCCGTGTTCTTAATGGAGAAATCCTTCACACTAAGAGTGCTGATTGAT 1740
putative1-FEH_P3      GTTGGGCATACCGTTCCGTGTTCTTAATGGAGAAATCCTTCACACTAAGAGTGCTGATTGAT 1740
putative1-FEH_K1      GTTGGGCATACCGTTCCGTGTTCTTAATGGAGAAATCCTTCACACTAAGAGTGCTGATTGAT 1740
putative1-FEH_P2      GTTGGGCATACCGTTCCGTGTTCTTAATGGAGAAATCCTTCACACTAAGAGTGCTGATTGAT 1740
*****

putative1-FEH_P1      CACTCAATCGTGGAAAGTTTTCACAAAGAGGGAGAGCTAGTATGACGCTAGAGTGTAT 1800
putative1-FEH_P3      CACTCAATCGTGGAAAGTTTTCACAAAGAGGGAGAGCTAGTATGACGCTAGAGTGTAT 1800
putative1-FEH_K1      CACTCAATCGTGGAAAGTTTTCACAAAGAGGGAGAGCTAGTATGACGCTAGAGTGTAT 1800
putative1-FEH_P2      CACTCAATCGTGGAAAGTTTTCACAAAGAGGGAGAGCTAGTATGACGCTAGAGTGTAT 1800
*****

putative1-FEH_P1      CCAACAGAGGCAATTTACAACGATGCACGCTGTTGTGCTTCAATAATGCGACTGGTGCT 1860
putative1-FEH_P3      CCAACAGAGGCAATTTACAACGATGCACGCTGTTGTGCTTCAATAATGCGACTGGTGCT 1860
putative1-FEH_K1      CCAACAGAGGCAATTTACAACGATGCACGCTGTTGTGCTTCAATAATGCGACTGGTGCT 1860
putative1-FEH_P2      CCAACAGAGGCAATTTACAACGATGCACGCTGTTGTGCTTCAATAATGCGACTGGTGCT 1860
*****

putative1-FEH_P1      TCCATTACTGCATCGAGTTTGAATTTGTGGCATATGAAGTCAGCATCAATAGTAACCTG 1920
putative1-FEH_P3      TCCATTACTGCATCGAGTTTGAATTTGTGGCATATGAAGTCAGCATCAATAGTAACCTG 1920
putative1-FEH_K1      TCCATTACTGCATCGAGTTTGAATTTGTGGCATATGAAGTCAGCATCAATAGTAACCTG 1920
putative1-FEH_P2      TCCATTACTGCATCGAGTTTGAATTTGTGGCATATGAAGTCAGCATCAATAGTAACCTG 1920
*****

putative1-FEH_P1      GTGGATCTTTAG 1932
putative1-FEH_P3      GTGGATCTTTAG 1932
putative1-FEH_K1      GTGGATCTTTAG 1932
putative1-FEH_P2      GTGGATCTTTAG 1932
*****

```

第14図 Onion9132遺伝子の塩基配列。
同一の塩基配列は*を付し、異なる部分は■で示す。

```

putative_1-FEH_K1 MSSFRDLESPLSSLSPILLSPEESAPROAKKAYFVSVALMLLMLGLAAFFVFSGTDVTG 60
putative_1-FEH_P1 MSSFRDLESPLSSLSPILLSPEESAPROAKKAYFVSVALMLLMLGLAAFFVFSGTDVTG 60
putative_1-FEH_P2 MSSFRDLESPLSSLSPILLSPEESAPROAKKAYFVSVALMLLMLGLAAFFVFSGTDVTG 60
putative_1-FEH_P3 MSSFRDLESPLSSLSPILLSPEESAPROAKKAYFVSVALMLLMLGLAAFFVFSGTDVTG 60
*****

putative_1-FEH_K1 WDPMHRDP I VDRGVKAGVSNKGSIGTGMLKVGSPWTNQMILLWQSGFHFQPEKNMWN 120
putative_1-FEH_P1 WDPMHRDP I VDRGVKAGVSNKGSIGTGMLKVGSPWTNQMILLWQSGFHFQPEKNMWN 120
putative_1-FEH_P2 WDPMHRDP I VDRGVKAGVSNKGSIGTGMLKVGSPWTNQMILLWQSGFHFQPEKNMWN 120
putative_1-FEH_P3 WDPMHRDP I VDRGVKAGVSNKGSIGTGMLKVGSPWTNQMILLWQSGFHFQPEKNMWN 120
*****

putative_1-FEH_K1 DPNGPMYYNGWYHFFYQYNPEAAVWGN IAWGHAVSKDLLNWVHLPLAMVDRSYDADGVW 180
putative_1-FEH_P1 DPNGPMYYNGWYHFFYQYNPEAAVWGN IAWGHAVSKDLLNWVHLPLAMVDRSYDADGVW 180
putative_1-FEH_P2 DPNGPMYYNGWYHFFYQYNPEAAVWGN IAWGHAVSKDLLNWVHLPLAMVDRSYDADGVW 180
putative_1-FEH_P3 DPNGPMYYNGWYHFFYQYNPEAAVWGN IAWGHAVSKDLLNWVHLPLAMVDRSYDADGVW 180
*****

putative_1-FEH_K1 TGSATILPDGR IIMLYTGLLNGTVQVQNI AVPANLSDPLLDWIKVDEINPVMILPPPGVG 240
putative_1-FEH_P1 TGSATILPDGR IIMLYTGLLNGTVQVQNI AVPANLSDPLLDWIKVDEINPVMILPPPGVG 240
putative_1-FEH_P2 TGSATILPDGR IIMLYTGLLNGTVQVQNI AVPANLSDPLLDWIKVDEINPVMILPPPGVG 240
putative_1-FEH_P3 TGSATILPDGR IIMLYTGLLNGTVQVQNI AVPANLSDPLLDWIKVDEINPVMILPPPGVG 240
*****

putative_1-FEH_K1 ADDFRDPSTAWFEPDSSTWRVTIGSKDASNSGIALVYSTKDFKFTLLPNTLHAAVKGM 300
putative_1-FEH_P1 ADDFRDPSTAWFEPDSSTWRVTIGSKDASNSGIALVYSTKDFKFTLLPNTLHAAVKGM 300
putative_1-FEH_P2 ADDFRDPSTAWFEPDSSTWRVTIGSKDASNSGIALVYSTKDFKFTLLPNTLHAAVKGM 300
putative_1-FEH_P3 ADDFRDPSTAWFEPDSSTWRVTIGSKDASNSGIALVYSTKDFKFTLLPNTLHAAVKGM 300
*****

putative_1-FEH_K1 WECIDFYPIATSEAEANKGLDLSEGPSLKTGHVHKASTSDNGQDYYSIGTYDPKANTWVP 360
putative_1-FEH_P1 WECIDFYPIATSEAEANKGLDLSEGPSLKTGHVHKASTSDNGQDYYSIGTYDPKANTWVP 360
putative_1-FEH_P2 WECIDFYPIATSEAEANKGLDLSEGPSLKTGHVHKASTSDNGQDYYSIGTYDPKANTWVP 360
putative_1-FEH_P3 WECIDFYPIATSEAEANKGLDLSEGPSLKTGHVHKASTSDNGQDYYSIGTYDPKANTWVP 360
*****

putative_1-FEH_K1 DVESLDVGVLRYDWGRFYASKTFYDEVKQRRILWGWKEADSESTDVTKGWASLG1PR 420
putative_1-FEH_P1 DVESLDVGVLRYDWGRFYASKTFYDEVKQRRILWGWKEADSESTDVTKGWASLG1PR 420
putative_1-FEH_P2 DVESLDVGVLRYDWGRFYASKTFYDEVKQRRILWGWKEADSESTDVTKGWASLG1PR 420
putative_1-FEH_P3 DVESLDVGVLRYDWGRFYASKTFYDEVKQRRILWGWKEADSESTDVTKGWASLG1PR 420
*****

putative_1-FEH_K1 TVLYDLNTKTHLLTWPVEEESLRTHEPDFSGITVDAGKTMELNVGGAQLDVEEFTIE 480
putative_1-FEH_P1 TVLYDLNTKTHLLTWPVEEESLRTHEPDFSGITVDAGKTMELNVGGAQLDVEEFTIE 480
putative_1-FEH_P2 TVLYDLNTKTHLLTWPVEEESLRTHEPDFSGITVDAGKTMELNVGGAQLDVEEFTIE 480
putative_1-FEH_P3 TVLYDLNTKTHLLTWPVEEESLRTHEPDFSGITVDAGKTMELNVGGAQLDVEEFTIE 480
*****

putative_1-FEH_K1 EKALELAI EEDVEYECNTSSGAAQRGLLGPFGLLVLANGDLTEQTATYFYYSKSDG6SFV 540
putative_1-FEH_P1 EKALELAI EEDVEYECNTSSGAAQRGLLGPFGLLVLANGDLTEQTATYFYYSKSDG6SFV 540
putative_1-FEH_P2 EKALELAI EEDVEYECNTSSGAAQRGLLGPFGLLVLANGDLTEQTATYFYYSKSDG6SFV 540
putative_1-FEH_P3 EKALELAI EEDVEYECNTSSGAAQRGLLGPFGLLVLANGDLTEQTATYFYYSKSDG6SFV 540
*****

putative_1-FEH_K1 THFCQDELRSSKASDTITEIVGHTVPVLNGESFTLRVLIDHSIVESFAQGGRASMTSRVY 600
putative_1-FEH_P1 THFCQDELRSSKASDTITEIVGHTVPVLNGESFTLRVLIDHSIVESFAQGGRASMTSRVY 600
putative_1-FEH_P2 THFCQDELRSSKASDTITEIVGHTVPVLNGESFTLRVLIDHSIVESFAQGGRASMTSRVY 600
putative_1-FEH_P3 THFCQDELRSSKASDTITEIVGHTVPVLNGESFTLRVLIDHSIVESFAQGGRASMTSRVY 600
*****

putative_1-FEH_K1 PTEAIYNDARLFVFNATGASITASSLNLWHMNSASNSNLVDL 643
putative_1-FEH_P1 PTEAIYNDARLFVFNATGASITASSLNLWHMNSASNSNLVDL 643
putative_1-FEH_P2 PTEAIYNDARLFVFNATGASITASSLNLWHMNSASNSNLVDL 643
putative_1-FEH_P3 PTEAIYNDARLFVFNATGASITASSLNLWHMNSASNSNLVDL 643
*****

```

第15図 Onion9132のアミノ酸配列。
同一のアミノ酸配列は*を付し、強い類似性のグループは:で示す。

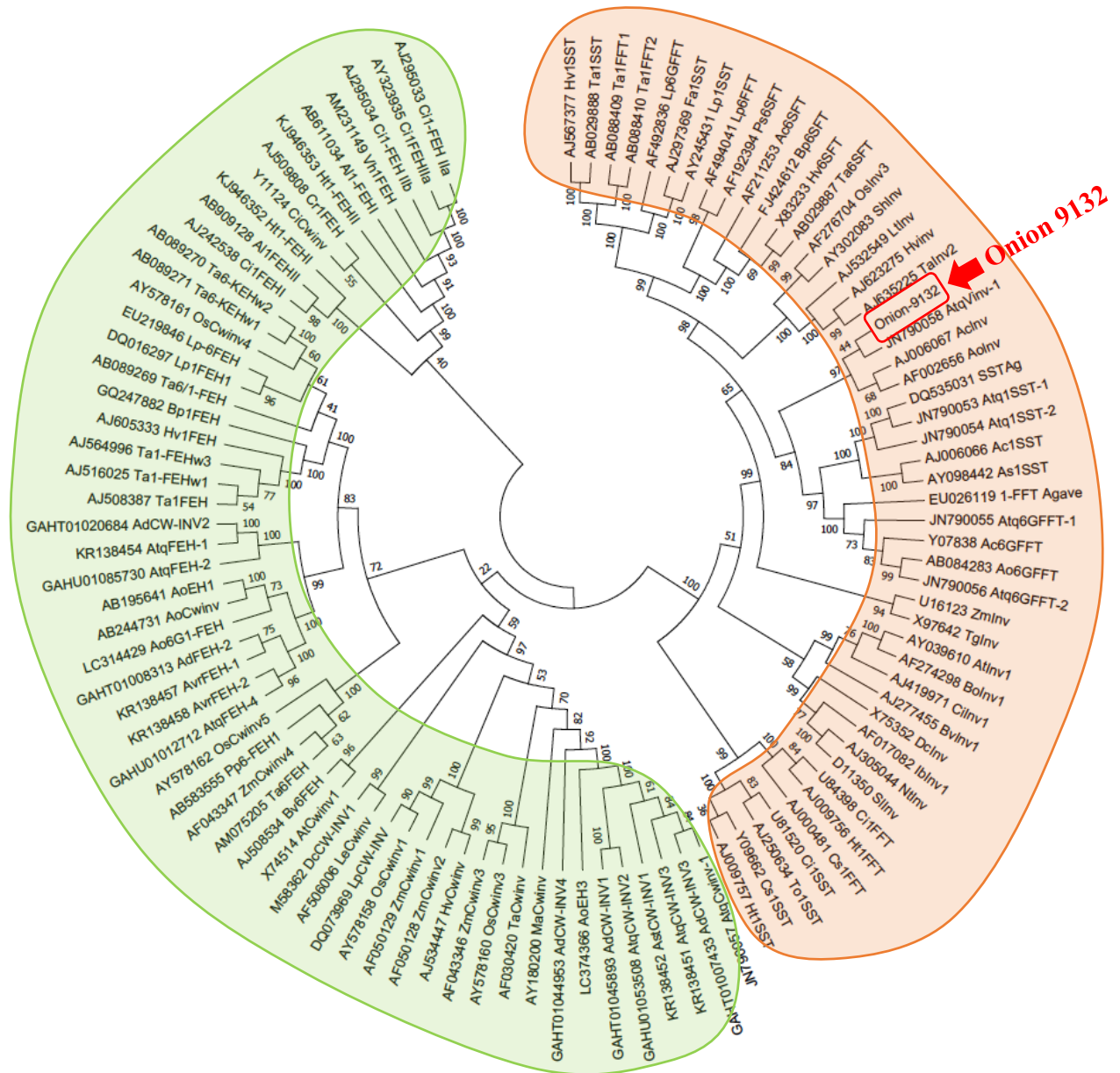
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	MAPSSLLSSGLSNLGLLFFSSSMFE 27	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	WGNMESDSAADLAKGWAIGIQAIVPRVFTLDRDQKRLIQWPVEEESLR 365
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	MAS—1FPGLWILGFSFGSSLFEI 24	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	WGNMESNSIADVDVAKGWAIGIQTVPVRLSLD—TDGKRLQVMP1EEESLR 367
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	MA—QMAFFLLALFSSFSYSR 21	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	WGNMESDTSADDVYKGAIGIHAIPRTIWL—SDGKRLQVMP1DEESLR 382
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	MA—QMAFLPLVLY—FQSYVTS 20	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	WGNMESDTSDDVYKGAIGIHAIPRTIWL—DNGKRLQVMP1EEESLR 391
O.sativa_CINV_AAT84404.1	MMAP1PQPMHKNPFLDILFFLVFSCSN 29	O.sativa_CINV_AAT84404.1	WGNMESDTSDDVYKGAIGIHAIPRTIWL—DNGKRLQVMP1EEESLR 389
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	MGNPKVLAIPWVALLQLASASHAR 27	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	LGMWESDSVAHDKAKGWAIGIQAIPKTIWL—PSGKRLQVMP1EEESLR 434
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	MCSERRVKEILGIMWLSGLQVWQGV 27	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	WGNMESDTSDDVYKGAIGIQAIPKTIWL—PSGKRLQVMP1EEESLR 430
Onion9132_K1	MSSFRDLESPLLSPLLSPEESAPROAKXAYFVSVALMLMLLAJLA 50	Onion9132_K1	WGNMESDTSDDVYKGAIGIQAIPKTIWL—PSGKRLQVMP1EEESLR 444
			** . * : : *** : : . ** . : . : * : : * :
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	PPPE—NLPNP—MVSSEFRT— 44	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	REKTIWNIELRTGSLVEVRLGVSQADVEFEFLPSFVGAEITFDEMIV 415
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	YRRH—LLYQDP1AQNF1ASELYRT 47	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	GEQIHLQDI1ELETQSQVVRGLKVSQADVEFEFLPSL1GAEPFDANNIV 417
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	LF1—CGRNEGGS—FLCARPEPELPS—IASERYRT 54	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	RNE1INHGELEKKGDLFIKIGDITLQADVEFEFLPSIDSDAPFPDSMLL 432
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	LFPPSYISGLCGGDDGGRSFLCAQAPQDDPSPAVSTMYKT 63	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	TNE1SHQGIELNKDLFIKEVDFAQADVEIFGELASIDADFPDPSMLL 441
O.sativa_CINV_AAT84404.1	LPGR—NGVEATORVFLYPSQK—VSSIYSKYGRYT 61	O.sativa_CINV_AAT84404.1	RNEVSHQGELEKKGDLFIKIGDITLQADVEFEFLPSIDSDAPFPDPSMLL 439
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	LSLE—TEAASPSVAPISVPLLR 50	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	GKPVWGDVYKVPQGHFPGFLGVSQSDVEFEFLPSIDSDAPFPDPSMLL 434
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	GVHS—SSPTE—ESQPYRT 43	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	TKQWITNREL1AAGELK1PIS1ASQADVEFEFLPSIDSDAPFPDPSMLL 419
Onion9132_K1	VFSYSDTYGNDPMDP1VDRGVKAGVSKGSG1GTGLMKVSGPWTH 100	Onion9132_K1	THEHFDG8ITVDAGKTNELN1VGAAGLDEVEFEFLPSIDSDAPFPDPSMLL 490
			: : . : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	—AYHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 86	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	DPKPLGREKYGAGN—GGVGFGLLLVLAADSLENTAVFFRVFRA—DQGYK 463
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	—AYHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 89	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	DPKPLGREKYGAGN1GGVGFGLLLVLAADSLENTAVFFRVFRA—EGSYK 466
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	—AYHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 85	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	DVEKKGRESGASV—GG1GPFGLVLAADSLENTAVFFRVFRA—HGSYN 480
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	—AHFQPAKAMNDPNSGMYKGFYHFYGHNDPGLWTANIS 104	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	DVEKKGRESGASV—GG1GPFGLVLAADSLENTAVFFRVFRA—HGSYN 480
O.sativa_CINV_AAT84404.1	—GYHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 102	O.sativa_CINV_AAT84404.1	DTEKKGRESGASV—GG1GPFGLVLAADSLENTAVFFRVFRA—HGSYN 487
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	—GYHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 101	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	DAKGLGK1GADVK—GGVGFGLVLAADSLENTAVFFRVFRA—DQGYK 463
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	—GFHFQSPRYMNDPNAPMYKGLYHFYGHNDPGLWTANIS 84	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	DPKPLGREKYGAGN—GGVGFGLLLVLAADSLENTAVFFRVFRA—DQGYK 463
Onion9132_K1	QMLLWQSGFHFQPKCN1NDPNSGMYKGFYHFYGHNDPGLWTANIS 149	Onion9132_K1	DVEYEGTSSGAAGRL1GPFGLVLAADSLENTAVFFRVFRA—DQGYK 540
	. : **** * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		* * . * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 136	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 513
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 139	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 516
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 145	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 530
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 154	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 539
O.sativa_CINV_AAT84404.1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 152	O.sativa_CINV_AAT84404.1	VLLCSLDRSSLRPGLYTPAYGFFVDELEKKEK1SLRTL1DHSVESFG 537
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 141	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 532
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 134	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	VLMGADRRSSKRNELYPKASGDFVD1DKKDK1SLRTL1DHSVESFG 516
Onion9132_K1	WGHVSSTDL1HWTLELALSRPDD1SGGSSSATILPDGKPV1LYTGL 199	Onion9132_K1	THFQDGLRSSKAD1T1E1VQ—HTVPVLMGESFTLRVL1DHSVESFG 588
	* : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		: : . : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	D—TVSRGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 182	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 561
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	D—TVSRGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 185	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 564
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	D—SQRGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 192	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 579
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	D—SQRGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 201	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 588
O.sativa_CINV_AAT84404.1	D—TEKRGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 199	O.sativa_CINV_AAT84404.1	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 585
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	DRPSVYQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 189	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	AGKTC1TSRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 580
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	D—VMSGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 180	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 564
Onion9132_K1	L—NGTVGVQNIAYPKNSDPFLRWTKP—DYNP1VFF—G1DVTFLR 246	Onion9132_K1	GGGRVIT1SRVYPTLLK—GNTHYAFYHGT—ETVK1SELN1MNSAQ1 637
	: * : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		* : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	PSTAMGQD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 229	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	S— 562
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	PSTAMGQD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 232	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	S— 565
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	PTTG1GPD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 239	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	NVIQ— 584
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	PTTG1GPD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 248	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	NVEKMSAI 597
O.sativa_CINV_AAT84404.1	PTTG1GPD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 246	O.sativa_CINV_AAT84404.1	NVRK— 590
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	PTTAMFAG—RHRM1VGBLPGTGLR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 236	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	NQA— 583
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	PSTAMGQD—GLNR1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 227	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	VPI— 568
Onion9132_K1	PSTAMFEPDSMTWRT1VGTVMNG—DGA1LYRSDFATVWRAEDPLHT 295	Onion9132_K1	SNLVDL— 643
	: * : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	NGSGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 285	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	S— 562
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	NGSGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 268	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	S— 565
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	NASAMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 284	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	NVIQ— 584
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	NGSGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 293	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	NVEKMSAI 597
O.sativa_CINV_AAT84404.1	NASAMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 281	O.sativa_CINV_AAT84404.1	NVRK— 590
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	ALTGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 286	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	NQA— 583
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	SKTGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 271	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	VPI— 568
Onion9132_K1	AKVGMVEQDFVPLGEV—EG—VTYKLLKVSIMYALHDI 345	Onion9132_K1	SNLVDL— 643
	*** : : . : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		
A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	YTLGTDEEDRVFVDDASNDYRMVPRVYGS1YASKTFDQKGRRI 315	A.offioinalie_668&1-FEH_BBE49	S— 562
A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	YTLGTDEEDRVFVDDASNDYRMVPRVYGS1YASKTFDQKGRRI 318	A.offioinalie_CINV_BAF93492.1	S— 565
L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	YMGVYDLQDAFVDPV1VLD—DRRLMLRIDYGFYASKTFDQKGRRI 333	L.perenne_1-FEH_AAY81958.2	NVIQ— 584
T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	YMGVYDLQDAFVDPV1VLD—DRRLMLRIDYGFYASKTFDQKGRRI 342	T.aestivum_1-FEH_CAD56806.1	NVEKMSAI 597
O.sativa_CINV_AAT84404.1	YMGVYDLQDAFVDPV1VLD—DRRLMLRIDYGFYASKTFDQKGRRI 340	O.sativa_CINV_AAT84404.1	NVRK— 590
L.perenne_CINV_AAZ29515.1	YTLGTDEEDRVFVDDASNDYRMVPRVYGS1YASKTFDQKGRRI 335	L.perenne_CINV_AAZ29515.1	NQA— 583
C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	YTLGTDEEDRVFVDDASNDYRMVPRVYGS1YASKTFDQKGRRI 321	C.intybus_1-FEH_CAC19366.1	VPI— 568
Onion9132_K1	YTLGTDEEDRVFVDDASNDYRMVPRVYGS1YASKTFDQKGRRI 394	Onion9132_K1	SNLVDL— 643
	* : . * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : *		

第16図 Onion9132と他の植物に含まれるFEHおよび細胞壁INVとのアライメント。
ECモチーフ , RDPモチーフ , WMNDPNGモチーフ  で示す。

A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	—MGSS—DLESPP—TSYASLPDDQ—PGSDPPSRRLLSIAMAATLLLF 45	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	YAIGTYPDAANKVDPDESQVIGRLYDWGKYASKTFDEQKRRVLN 399
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	—MASSRDESPSP—TSYAPLSDDEQRPSPAPSRRLRLTAIAMPPLLLA 46	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	YAIGTYPDPNTWKTPDDESQVIGRLYDLGKFYASKTFYDQEKRRVLN 406
Onion9132_K1	—MSSFRDLESPLSLSPLLSPEE—SAPRQAKKAYFVSVALMLLILA 45	Onion9132_K1	YAGTYPDAKNTWVPDESQVIGRLYDWGKYASKTFYDQEKRRVLN 395
A. ocea_VINV_GAA06839.1	—MSSD—DLESPP—SSYLP1PPSDEFHDGPPPLRLSLRLSIPALMLFLF 47	A. ocea_VINV_GAA06839.1	YAIGTYPDAKNTWVPDASQVIGRLYDWGKYASKTFYDQAKRRVLN 438
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	—MAT—SLQAPILG—SRPPRR—TLRFLSFLFSALV 31	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	YAIGTYPDAKNTWVPDDESQVIGRLYDWGKYASKTFYDQEKRRVLN 359
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	—MGSDGSPSP—SLHAP1VG—SPPPRRLTLRLSLSLASLVAF 40	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	YAIGTYPDAKNTWVPDDEI1DVIGRLYDWGKYASKTFYDQEKRRVLN 382
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	—MES—RDIESP—ALNAP1LQ—ASPP1KSSKLKVALATTSVL 40	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	YAGTYPDESFPVDDPOT1DVIGRLYDWGKYASKTFYDQEKRRVLN 372
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	—MASSTKDVAPP—TLDAP1LG—SAAPR—SRLRVAASVSLVAF 40	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	YALGSFQDLSFT1PDDOT1DVIGRLYDWGKYASKTFYDQEKRRVLN 370
			::: : ** :****:*** **::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	GLAALL—AIST—TESGLGDPDN 65	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	GW1SETDESAD1KGMASQIG1PRTVLDKMTKRSNLLTWPVVEESLRF 449
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	LAALF—LSGSQAVTDLVAPSS 69	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	GW1GESDESAD1KGMASQIG1PRTVLDKMTKRSNLLTWPIVEESLRS 456
Onion9132_K1	GLAAFY—FVSGTDTVGNDDP 63	Onion9132_K1	GW1GEADESDTDTKGMASQIG1PRTVLDKMTKTHLLTWPVVEESLRT 445
A. ocea_VINV_GAA06839.1	LATFLSNLESPSSDGLVSDPYTFDWNPAVRRGKDGASDKTSQVDSGF 97	A. ocea_VINV_GAA06839.1	SW1GETSETAD1KGMASQIG1PRTVLDKMTKRSNLLTWPIVEESLRT 448
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	LVAASFSSKSESSES 47	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	GYVGETSGDADYKGMASQIG1PRTVLDKMTKRSNLLTWPIVEESLRS 409
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	LLAALLLLSKSGSPVNPQGLD 62	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	GYVGETSREYD1KGMASQIG1PRTVLDKMTKRSNLLTWPIVEESLRS 432
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	LLIAAFFAVKYVSFDSSS 58	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	GYVGEVDSKADD1KGMASQIG1PRT1FDKTKSNNLLTWPIVEELDALRT 422
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	LLVAIAAAVLY—VNPQ 55	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	GYVGEVDSKDDAKGMASQIG1PRT1FDKTKSNNLLTWPIVEESLRT 420
			:::*** * ****:::***::***::***::***::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	—PVPAPDPQIMDRMLAAGVSSKSGVGP—LKLSSGGPYQNTQMILS 109	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	GLRDFSG1TIGASDTPLDVGAAGLD1EAEFLINKEALEATAEA—DVA 497
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	—PDTMPE1VTRDGEVEGVSXSGAQPGLLTSVSHQGYPTNTQMILS 115	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	MLHDFSG1T1DKGSDTHLDVGAAGLD1EAEFLINEESLAEAEAGTQVM 506
Onion9132_K1	—MHRDP1VDRGVKAGVSKSGS1GTGMLKVGS—YPTNTQMIL 104	Onion9132_K1	EHDFSG1TVDAGKTHLDVGAAGLDVEVEFT1EEKALEA1EAE—DVE 493
A. ocea_VINV_GAA06839.1	VLDPVAVDANSVYVHRGKDGASDKTSQVDSGLKDSPLGPYPNTQMILS 147	A. ocea_VINV_GAA06839.1	RPRDFSG1TVDAGSTFKLDVGAAGLD1EAEFLISSEELAEVKEA—DVS 536
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	—LRSGS—VEPEYANTQMIL 88	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	TRKDFSD1VWNGSTVELHVDAGLD1EAEFEDMDKDALEA1EAE—D1G 457
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	—A1LAPLQSGAQL—GEEDYPTTQMIL 66	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	TSKDFSNV1SPGDTQGLD1GDAGLD1EAEFELKEELAEV1EAE—DVT 480
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	—QLLKDDPPSDS—EDYPTNTQMIL 80	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	SKGDFNGVYVEPQSTYHLDVGTATQD1EAEFELINKEADVAEVA—DVT 470
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	—GVASNNMLRLE—NDYPTNTQMIL 77	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	INKNFNS1PLPYSTQYLDVGEATQD1EAEFVEDEKDALEATAEA—DVT 468
			:::*** ** **::***::***::***::***::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—N1ANGHA 158	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	YEOGTSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 547
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—D1ANGHA 164	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	YNGSGGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 556
Onion9132_K1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—N1ANGHA 153	Onion9132_K1	YEOGTSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 543
A. ocea_VINV_GAA06839.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—N1ANGHA 196	A. ocea_VINV_GAA06839.1	YNGSSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 586
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—D1ANGHA 114	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	YNGSSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 507
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—N1ANGHA 137	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	YNGSTSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 530
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—D1ANGHA 130	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	YNGSTSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 520
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	WQRTGFHFOPERNNDPNGPLYYGNYHFFFYQNPDAAVWG—D1ANGHA 127	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	YNGSTSGGAARGLGFFGLVLNAGLDEQTATYFYYSRGTGDLRTHF 518
	::::***::***::***::***::***::***::***::***		***::***::***::***::***::***::***::***::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	VSRDLVRNHLPLALAPDQWYDIKGVNWSGATLLPD—GRVILLYTGAT— 205	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 597
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 211	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 606
Onion9132_K1	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 200	Onion9132_K1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 593
A. ocea_VINV_GAA06839.1	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 243	A. ocea_VINV_GAA06839.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 636
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 162	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 557
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	ASRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 186	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 580
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 177	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 570
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	VSRDLVRNHLPLAMVPRDQWYDINGVWTSATLLPD—GRVILLYTGAT— 174	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	QDDELRSKASDTVKVY1GHTVPLAGETLSRL1VDHS1VESFAQGRRA 568
	::::***::***::***::***::***::***::***::***		***::***::***::***::***::***::***::***::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 254	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SGTDF1 646
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 261	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 655
Onion9132_K1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 250	Onion9132_K1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 643
A. ocea_VINV_GAA06839.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 292	A. ocea_VINV_GAA06839.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 685
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 212	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 629
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 235	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 620
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 226	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 620
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	NESAQVQNLAVPVDLNPDLRNWKA—EAMPVNVPPG1GVDGDFDPTTA 223	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	SATSRVYPTA1YNSARVFLFNATGATVARTKL1WNNHNS—SRPFD 618
	::::***::***::***::***::***::***::***::***		***::***::***::***::***::***::***::***::***::***
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 297	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	NDGAGQ 662
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 297	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	
Onion9132_K1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 297	Onion9132_K1	
A. ocea_VINV_GAA06839.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 339	A. ocea_VINV_GAA06839.1	ATSVIN— 690
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 261	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	TSSN— 610
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 284	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	PSLKAQ— 635
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 271	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	PAP— 623
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	WYFESDSTR1V1GSKDA—SHSG1ALVYSTKDFKFTLLPNTLHVAJK— 271	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	VAP— 621
	::::***::***::***::***::***::***::***::***		
A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 349	A. tequilana_VINV_AFJ21575.1	
A. officinalis_VINV_AAB71136.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 356	A. officinalis_VINV_AAB71136.1	
Onion9132_K1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 348	Onion9132_K1	
A. ocea_VINV_GAA06839.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 385	A. ocea_VINV_GAA06839.1	
A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 309	A. officinalis_66-FFT_BAD89564.	
A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 332	A. tequilana_1-FFT_ABS72186.1	
A. ocea_1-SST_GAA06838.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 322	A. ocea_1-SST_GAA06838.1	
A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	VGMNEGIDLYPIATSAAG—ANRGLDPSAR—PSNLKVHVLKASDSDSDY 320	A. tequilana_1-SST_AFJ21570.1	
	::::***::***::***::***::***::***::***::***		

第17図 Onion9132と他の植物に含まれるフルクタン合成酵素および液胞INVとのアライメント。ECモチーフ  , RDPモチーフ  , WMNDPNGモチーフ  で示す。

液胞インベルターゼ
フルクタン合成酵素



フルクタン加水分解酵素
細胞壁インベルターゼ

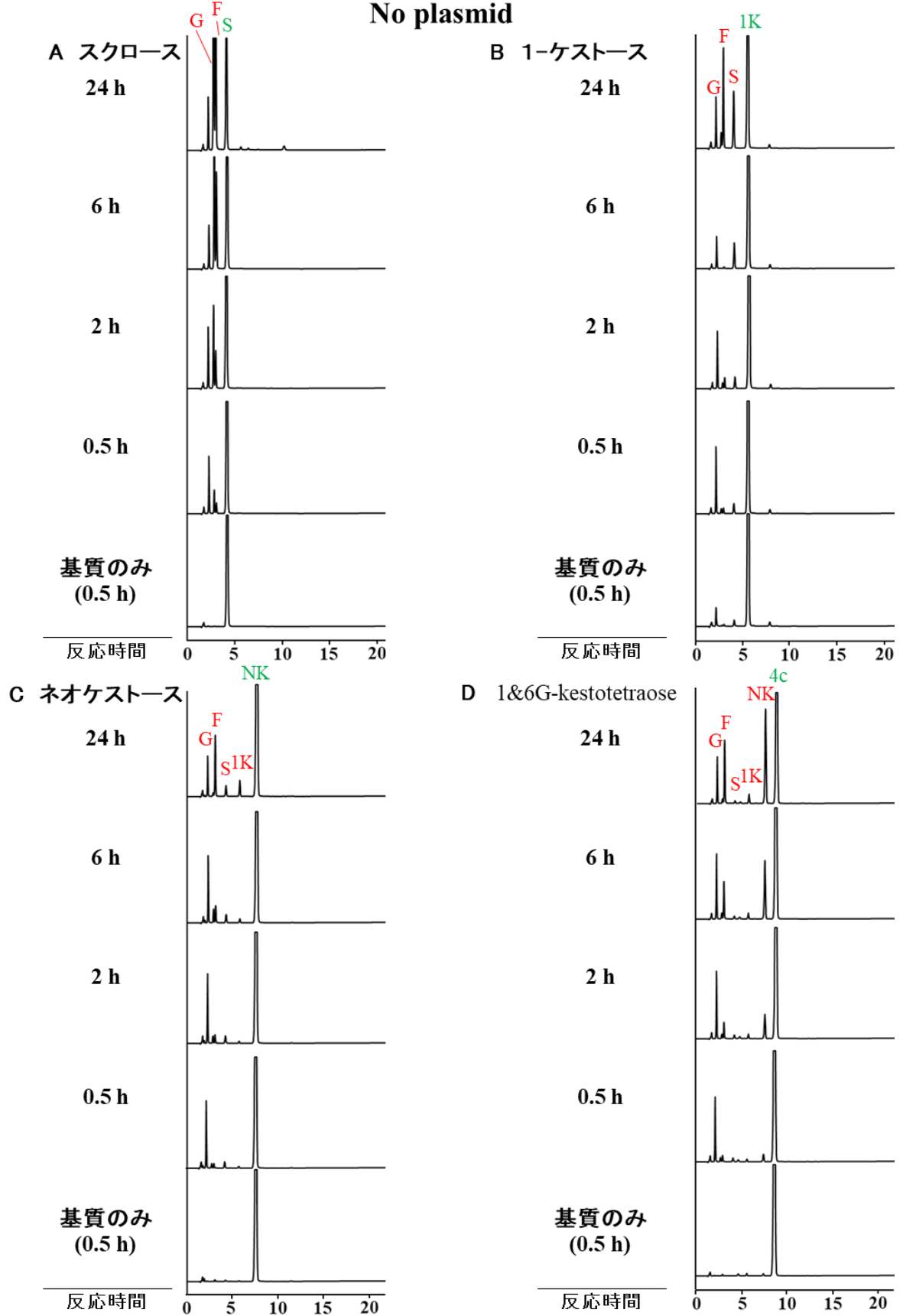
第18図 Onion 9132、フルクタン合成酵素、分解酵素および酸性インベルターゼ（細胞壁インベルターゼ、液胞インベルターゼ）の系統解析。

■ フルクタン加水分解酵素と細胞壁インベルターゼで構成されるクレード

■ フルクタン合成酵素と液胞インベルターゼで構成されるクレード

Onion 9132は、フルクタン合成酵素と液胞インベルターゼのクレードに属する。

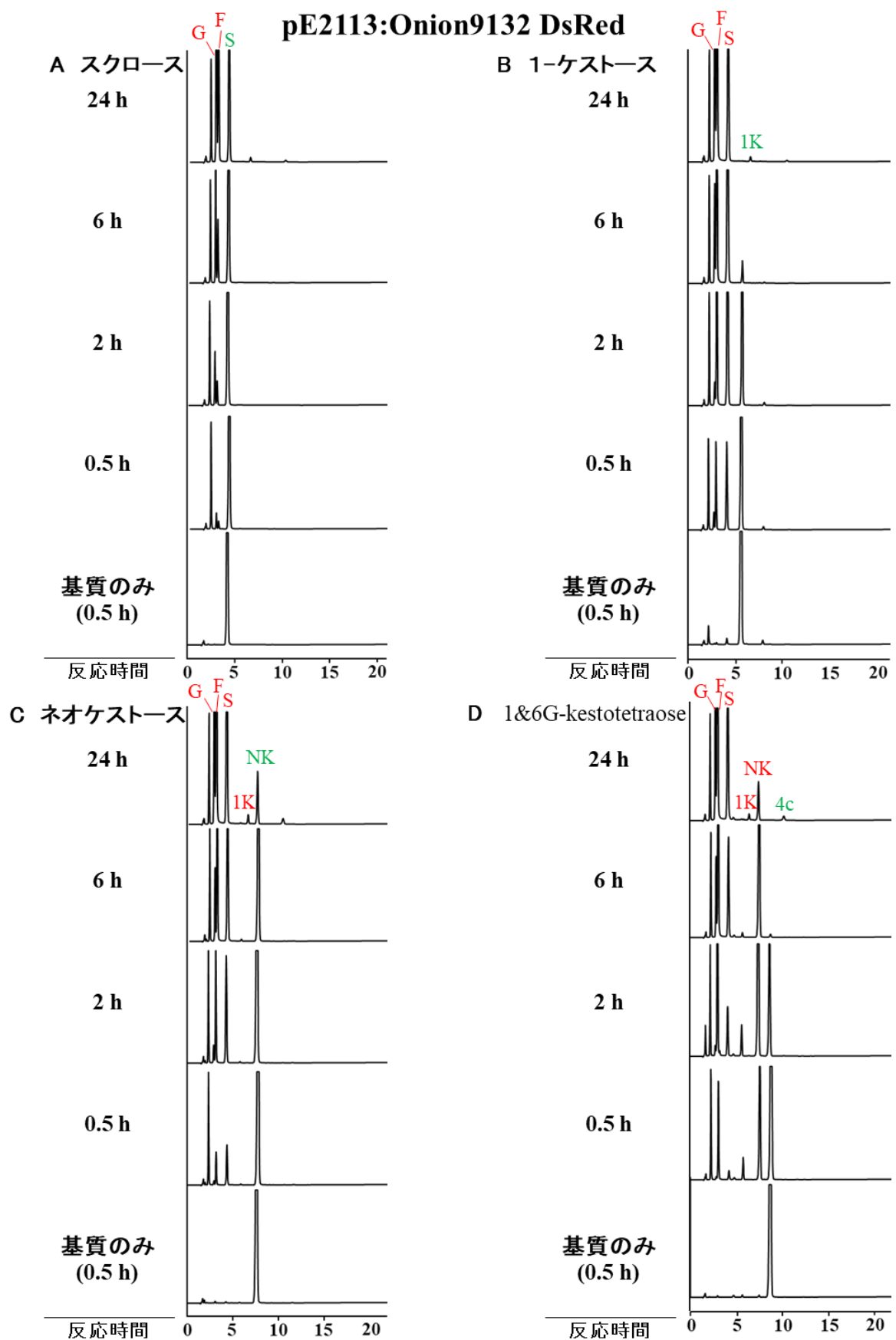
No plasmid



第19図 プラスミドを導入していない対照区の経時別の反応生成物のクロマトグラム.

[基質] A:スクロース, B:1-kestose, C:ネオkestose, D: 1&6G-kestotetraose

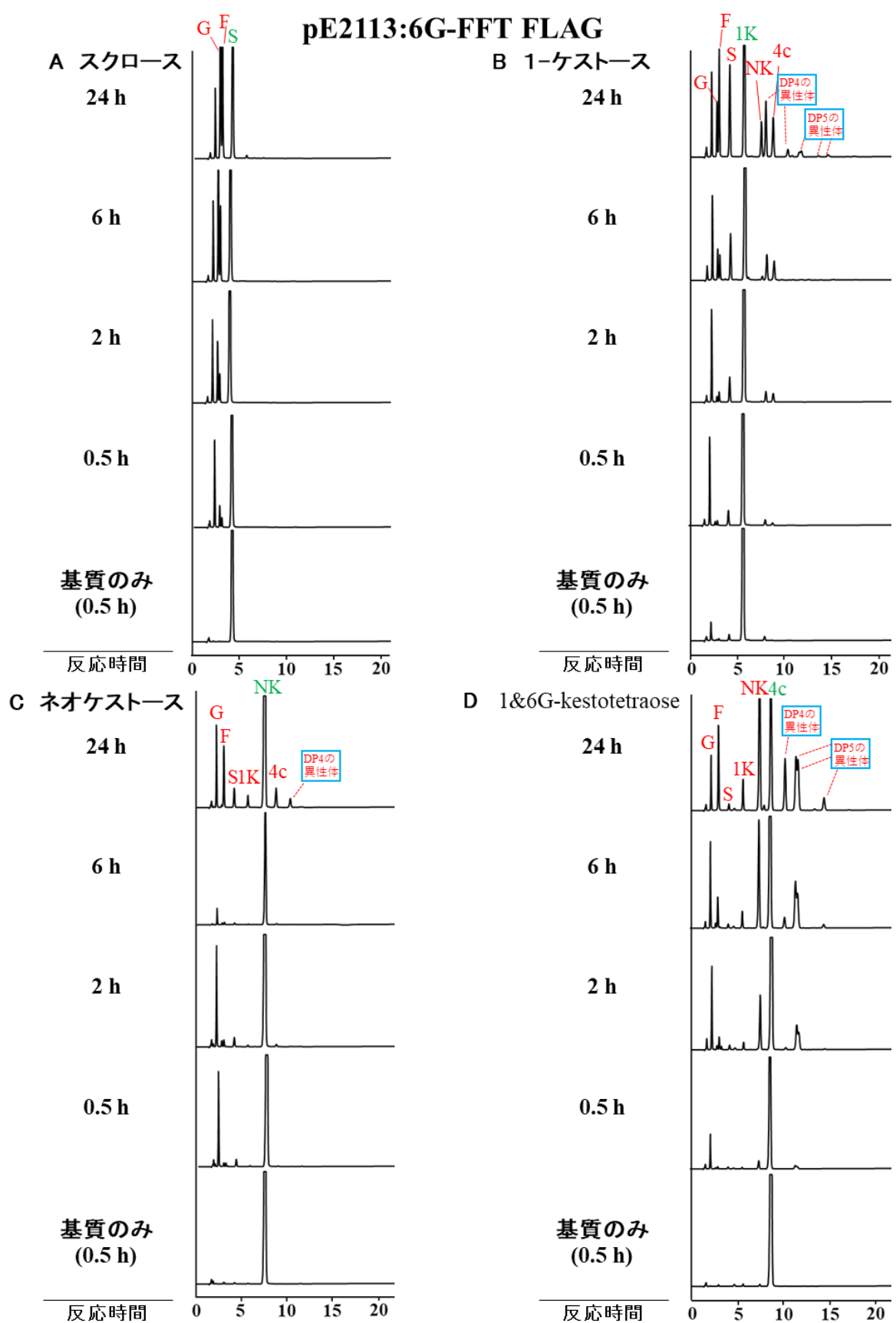
[反応生成物] G:グルコース, F:フルクトース, S:スクロース, 1K: 1-kestose, NK: ネオkestose, 4c: 1&6G-kestotetraose 基質は緑色、反応生成物は赤色で示す.



第20図 pE2113:Onion9132 DsRedの経時別の反応生成物のクロマトグラム.

[基質] A:スクロース, B:1-ケストース, C:ネオケストース, D:1&6G-kestotetraose

[反応生成物] G:グルコース, F:フルクトース, S:スクロース, 1K: 1-ケストース, NK: ネオケストース, 4c: 1&6G-kestotetraose 基質は緑色、反応生成物は赤色で示す.

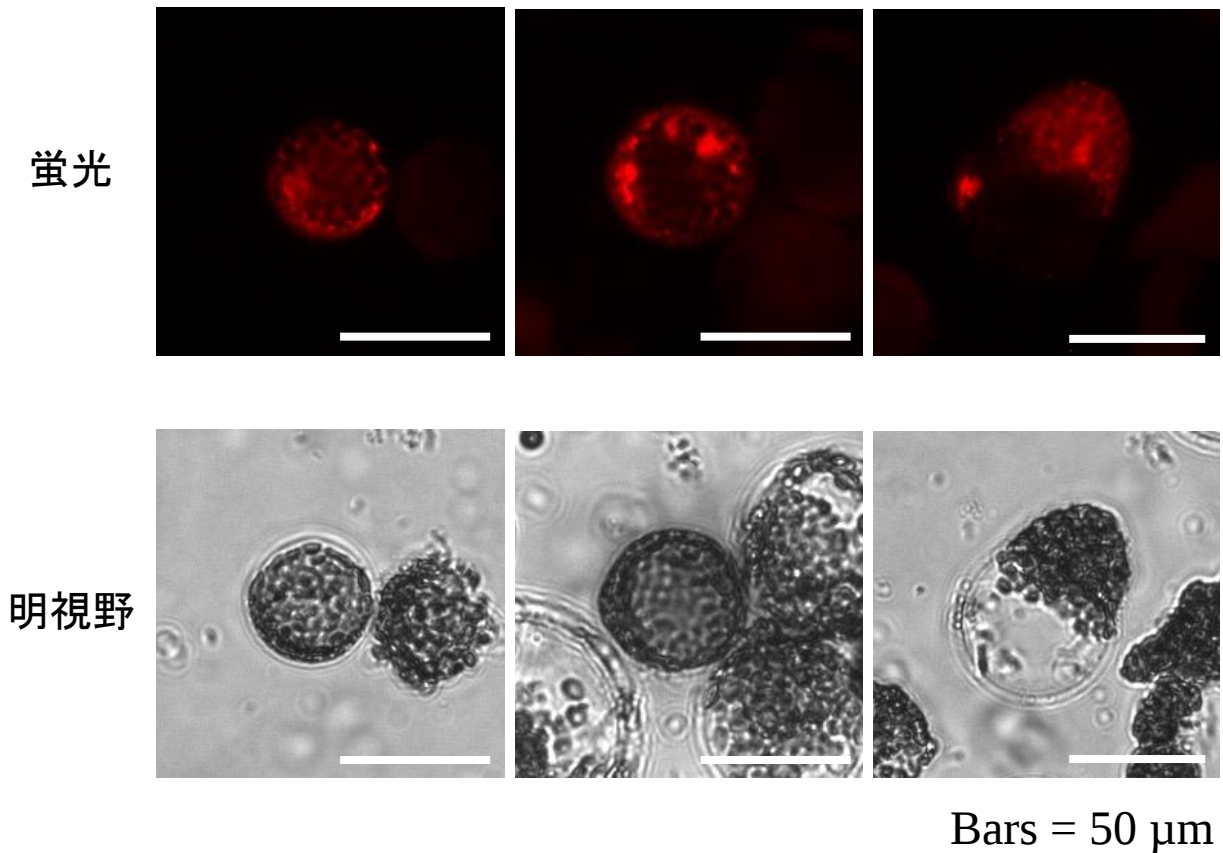


第21図 pE2113:6G-FFT FLAGの経時別の反応生成物のクロマトグラム.

[基質] A:スクロース, B:1-ケストース, C:ネオケストース, D:1&6G-kestotetraose

[反応生成物] G:グルコース, F:フルクトース, S:スクロース, 1K: 1-ケストース, NK: ネオケストース, 4c: 1&6G-kestotetraose 基質は緑色、反応生成物は赤色で示す.

pE2113:Onion 9132 DsRed



第22図 pE2113:Onion9132 DsRedの顕微鏡写真.
蛍光波長579 nmで測定。横線は、50 μm のスケールを示す.

第1表 核酸抽出緩衝液

1 M Tris-HCl (pH 7.5)	10 mL
1 M MgCl ₂	10 mL
1M KCl	10 mL
1% SDS	40 g
Milli-Q水	X mL
合計	400 mL
オートクレーブ後に使用	

第2表 TURBO Dnase処理

Total核酸	X µL
10× TURBO DNase Buffer	5 µL
TURBO DNase	1 µL(2 unit)
滅菌水	Y µL
合計	50 µL
(X + Y = 44 µL)	
混合後、37°C, 30分インキュベート	

第3表 ReverTra AceによるcDNA合成

① 4×DN Master Mix	2 µL
RNA template	500 ng
滅菌水	X µL
合計	8 µL
混合後、37°C, 5分間インキュベート	

② ①の反応液	8 µL
5× RT Master Mix II	2 µL
合計	10 µL

混合後、サーマルサイクラーで以下の反応を行った

37°C, 15分

50°C, 5分

98°C, 5分

10°C, hold

反応後は、10 ng/µLに希釈した

第4表 Onion9132(1-FEH)のクローニングで用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'→3')
FT-uni-Fd1	CMTGGGGGYCAYGCNGTNTC
FT-uni-Rv1	ACVARHARVCCRAAHGGYCC
FT-3race-Fd1	GAGGCCGATAGTGAGAGCAC
FT-3race-Fd2	TTGGGCATACCGTTCCTGTTC
FT-5race-Rv1	GGCTCTCCACATCAGGAACC
FT-5race-Rv2	GAGCGATACCGCTATTGGATG
9132-ORF-Fd1	ATGTCTTCGTTTAGAGACTTGGAG
9132-ORF-Rv1	CTAAAGATCCACCAAGTTACTATTG

第5表 KOD -Plus-を用いたPCR

10× Buffer for KOD -Plus- Ver.2	2.5 μL
2 mM dNTPs	2.5 μL
25 mM MgSO ₄	1.5 μL
Forward primer	0.2 μL
Reverse primer	0.2 μL
テンプレートcDNA	2 μL(20 ng)
KOD -Plus- (1 unit/μL)	1 μL
滅菌水	X μL
合計	25 μL

混合後、サーマルサイクラーで以下の反応を行った

94°C, 2分	}	35サイクル
98°C, 10秒		
55°C, 30秒		
68°C, 2分		
10°C, hold		

第6表 プロトプラスト発現ベクターの作製に用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'→3')
Dsmono-Xba-Fd	TCTAGAATGGACAACACCGAGGACGTC
Dsmono-Sac-Rv	GAGCTCCTACTGGGAGCCGGAGTGG
G3S3-Dsmono-Fd	GGTGGCGGAAGCGGCGGAGGTAGTGGCGGAGGTAGCATGGACAACACCGAGGACGTC
Spe-9132-Fd	GCGACTAGTATGTCTTCGTTTAGAGAC
9132-1393-Rv	CATTAAGTTCCATAGTTTTCCCAGCATCCA
9132-1374-Fd	GAAAACTATGGAACCTAATGTAGGTGGTGCTGCA
Sma-6GFT-Fd	GCGCCCGGGATGGATGCTCAGGATATT
6GFT-G3S3-Rv	TCCGCCGCTTCCGCCACCAAAATGATAAAAATCATTGTAAGTGGA

第7表 MMg solution

Mannitol	3.64 g
2 M MgCl ₂	375 mL
200 mM MES (pH 5.7)	1 mL
Milli-Q水	X mL
合計	50 mL

0.2 μmのフィルターろ過滅菌後に使用

第8表 PEG solution

PEG 4000	16 g
0.8 M Mannitol	10 mL
1 M CaCl ₂ ・H ₂ O	4 mL
Milli-Q水	12 mL
合計	40 mL

0.2 μmのフィルターろ過滅菌後に使用

第9表 W5 solution

3.08 M NaCl	2.5 mL
1 M CaCl ₂ ・H ₂ O	6.25 mL
200 mM KCl	1.25 mL
200 mM MES (pH 5.7)	0.5 mL
Milli-Q水	X mL
合計	50 mL

0.2 μmのフィルターろ過滅菌後に使用

第10表 プロトプラスト培養液

MS 培地用混合塩類	0.23 g
Mannitol	3.64 g
Sucrose	0.5 g
0.5 mg/mL 2,4-D	20 μL
2 mg/mL 塩酸チアミン	25 μL
Milli-Q水	X mL
合計	50 mL

KOHでpH 5.8に調整

第4章 MALDI-TOF MS Imaging を利用したタマネギ鱗茎におけるフルクタン分布の可視化

これまでタマネギ組織に含まれるフルクタン分布を調査した報告は、薄層クロマトグラフィーとゲル浸透クロマトグラフィーを組み合わせた 1 例 (Darbyshire and Henry., 1978) しかなく、それ以降で詳細な研究は報告されていない。タマネギの葉 (普通葉、保護葉、肥厚葉および鱗葉を含む) の枚数は品種により様々であり、気象条件や生育環境にも影響をうける。同一栽培条件で育てた個体同士でも葉の枚数が異なることもあることから、タマネギにおけるフルクタン分布の一定の評価が困難になっていると考えられている (青葉, 1955)。

近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置イメージング (MALDI-TOF MSI) による生体分子や代謝物の可視化が注目を集めている。MALDI-TOF MSI は、生体から切り出した組織切片試料に等間隔でレーザー照射して質量分析を行う。測定結果をもとに試料面の成分分析を 2 次元的に表示することができることから、生体成分の視覚的な局在解析を行うことができる。医療や植物研究の分野でも、MALDI-TOF MSI を用いた研究が多く報告されるようになっていた (Boughton et al., 2015; Kriegsmann et al., 2015; Kaspar et al., 2011; Yoshimura et al., 2012; Peukert et al., 2014)。タマネギやアスパラガスの根では、MALDI-TOF MS を利用してフルクタン組成を評価した報告があるが (Maeda et al., 2017; Suzuki et al., 2011)、タマネギで MALDI-TOF MSI を利用した例はない。特に、MALDI-TOF MSI は複雑な抽出作業が不要で、動植物に含まれる多種類の化合物を同時に測定できる利点があるだけでなく、化合物の分布を可視化して把握できる利点もある。このことから本章では、タマネギ鱗茎に含まれるフルクタン分布を明らかにするために、MALDI-TOF MSI 技術を用いてタマネギ鱗茎におけるフルクタン分布の可視化を試みた。また、MALDI-TOF MSI は質量分析機器であるため本来は定性分析に用いられるが、定量性については十分な検証が行われていない。そこで MALDI-TOF MSI に用いたサンプルと同じ試料のフルクタン含量を HPLC-ELSD でも分析し、MALDI-TOF MSI の結果を裏付けできるか確認した。

第1節 材料および方法

(1) 植物材料

鱗茎組織の凍結方法の検討では、2016 年 9 月に市販されていた直径 3~4cm 程度の大きさの小型のタマネギ鱗茎 (ペコロス) を用いた。皮の保護葉を取り除き、可食部を実験に用いた。

MALDI-TOF MSI には、第 2 章第 1 節で示した 2016 年 8 月に収穫した‘北もみじ 2000’ (2 か月間冷暗所に保管) の鱗茎を用いた。上記と同様に、保護葉を取り除いた可食部を用いた。

(2) 凍結組織切片作製

タマネギ鱗茎からの凍結組織切片作製には、クライオスタットミクローム CM3050 S (Leica, Wetzlar, Germany) を用いた。タマネギ鱗茎の凍結には、鱗茎を赤道面で切ったものをそのまま -80℃ で凍結させる方法と、鱗茎を赤道面で切ったものを包埋剤である 2% の冷カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC) 溶液 (ナカライテスク) に浸漬して -80℃ で凍結させる方法の 2 種類を用いて比較した。十分に凍結させたタマネギ鱗茎を -20℃ 内で 1 時間クライオスタットミクロームの中で静置後に切片を作製した。50 μm で切片を作削し、電導性の ITO コートスライドガラス (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) に伸展させた。伸展中は、スライドガラスの反対側から指先で温めることでスライドガラス上の切片を修正し、常温で微量の水分を気化させた。

(3) マトリックス塗布

MALDI-TOF MSI 用の試料作製では、凍結切片は 2% CMC 溶液に凍結包埋し、凍結組織切片を 50 μm の厚さで作製した。MALDI-TOF MS は、通常であれば紫外線レーザーを照射しても気化およびイオン化されずに質量分析できない試料でも、マトリックスを添加することで試料とマトリックスを同時に気化・イオン化することによって、質量分析を可能とする方法である。マトリックスによって適応できる分子量が異なり、タマネギやアスパラガスのフルクタン分析には、2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) が用いられてきた (Maeda et al., 2017; Suzuki et al., 2011, 2013)。そのため、本実験でも DHB を用いることとした。1 mL の 70% メタノール (和光純薬工業) に溶かした 50 mg/mL の DHB (ナカライテスク) 溶液を作製し、この DHB 溶液をエアブラシ HP-CP (Anest iwata ampbell, Tokyo, Japan) を使って組織切片に散布した。エアブラシ先端と組織切片との距離は約 10 cm を維持し、マトリックスが試料面に均一に散布されるように行った。

(4) MALDI-TOF MSI 解析

ultrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) を用いて MALDI-TOF MSI を行った。測定条件は、次の通りである。レーザー波長: 337 nm の窒素レーザー、測定範囲: 140~2000 m/z 、測定間隔: 250 μm 、測定回数: 測定部位 1 か所につき 500 回。植物組織にはカリウムが豊富に含まれているため、カリウムイオンが検出できるリニアポジティブイオンモードで測定した。測定前に、マトリックス塗布した組織切片をプリンター (EPSON EP-804A) でスキャンし、ス

キャン画像から測定部位を指定した。測定後は、解析ソフト(flexImaging v4.0, Bruker Daltonics)を用いて、分子量別の分布や蓄積度合いをヒートマップで組織切片のスキャン画像上に示し、フルクトンの重合度別に蓄積分布の評価を行った。

(5) HPLC-ELSD 分析

凍結組織切片の作製に用いた鱗茎部分の上部 1 cm を切り出し、さらに 3 等分(外側、中間、内側)して、それぞれ凍結乾燥粉末にした。第 2 章第 1 節で示した方法と同様に、鱗茎組織部位別に遊離糖とフルクトンを抽出し、HPLC-ELSD で遊離糖とフルクトンの定量を行った。

第 2 節 結果および考察

I. 凍結組織切片作製方法の検討

包埋剤処理の有無が異なる凍結切片の様子を第 23 図に示した。赤道面で切断してそのまま凍結して作製した凍結切片は、鱗茎の外側の葉の部分が欠けていた。一方、2%の冷 CMC 溶液で凍結包埋処理をしてから作製した凍結切片は、きれいに外側の葉の切片ができていた。鱗茎組織の外側に白く残っている部分がみられるが、これは包埋剤も一緒に切片化されたものであり、鱗茎の凍結切片上にはみられなかったことから MALDI-TOF MSI 分析には影響を及ぼさないものと考えられる。タマネギ鱗茎は、普通葉、肥厚葉および鱗葉など多くの葉が集まってできた部位であり、細胞壁が固いために切片作製は容易ではないとされてきた(高橋, 2013)。しかし、本研究で用いた CMC 包埋後の凍結切片では、切削面上に影響を及ぼすことなく切片作製が可能であった。CMC は増粘剤や乳化安定剤として食品・非食品にかかわらず広い分野で利用されているため、毒性の心配なく切片作製できるメリットもあると考えられる。よって以後の実験では、CMC で凍結包埋処理した組織切片を用いて、MALDI-TOF MSI 分析を行うこととした。

イチゴやトマトの場合、タマネギ鱗茎と同様に凍結包埋処理をして MALDI-TOF MSI 解析を行っている(Enomoto et al., 2018; Bencivenni et al., 2014)。一方、オオムギ、トマトおよびリンゴ果実の場合、凍結包埋処理をせずにそのまま凍結切片を作製した報告もある(Peukert et al., 2014; Nakamura et al., 2017; Horikawa et al., 2019)。したがって、凍結包埋処理の必要性は、実際に作業する人の技量や切削する組織部位によって、変わるのかもしれない。しかし、複数の葉に囲まれているタマネギ鱗茎の場合、固さが異なる様々な組織が相まっていることから、

凍結切片作製には凍結包埋処理が必要不可欠な方法であると考えられる。

II. MALDI-TOF MSI を用いたタマネギ鱗茎の凍結組織切片上のフルクタン分布の可視化

‘北もみじ 2000’の鱗茎を用いた MALDI-TOF MSI におけるマスペクトラムの一例を第 24 図に示した。 $[M + K]^+$ で検出した可用性炭水化物由来のピークは 9 種類で、過去の報告と m/z の値が一致した (Suzuki et al., 2011; Maeda et al., 2017)。これら 9 種類のピークは m/z 381.0, 543.0, 705.4, 867.3, 1029.3, 1191.3, 1353.3, 1515.5, 1677.6 であり、各々スクロースおよび DP3~10 のフルクタンであることが分かった。

‘北もみじ 2000’鱗茎を用いた場合でも、凍結包埋処理を行うことで鱗茎全体が含まれる凍結組織切片を作製できた。MALDI-TOF MSI でタマネギ鱗茎の組織切片のイメージング解析を行った結果を第 25 図に示した。9 種類のピークのうち、イメージング解析できたのは、 m/z 1677.6 (DP10)を除く 8 種類であった。MALDI-TOF MSI の結果、スクロースおよび DP3~4 のフルクタンは、鱗茎全体に分布していた。一方、DP5~9 のフルクタンは重合度が増加するにつれて中心の鱗葉部分でのみ検出されるようになり、局在していることが確認された。

III. HPLC-ELSD によるタマネギ鱗茎の部位別フルクタン含量の測定

‘北もみじ 2000’の鱗茎における部位別に測定した遊離糖とフルクタン含量の結果を第 26 図に示した。総糖含量は、外側で $374.9 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、中間で $568.1 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、内側で $517.12 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ であった。遊離糖は、フルクトース、グルコース、スクロースが検出された。フルクトースおよびグルコース含量は、中間が外側や内側と比べて高い傾向を示していたのに対して、スクロース含量は、内側が若干高かったものの有意差は認められなかった。フルクタン含量は、外側で $64.7 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、中間で $119.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ 、内側で $160.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ DW}$ であり、内側部分が中間部分や外側部分と比べて有意に高かった。また、‘北もみじ 2000’の鱗茎各組織における遊離糖とフルクタンの組成別含量を第 27 図に示した。その結果、遊離糖では、部位にかかわらずスクロース含量が最も高かった。また、フルクタンは、どの部位でも DP3 含量が最も高く、重合度の高いものほど蓄積量が少なくなった。部位別にみると、外側では DP3~7、中間では DP3~8、内側では DP3~9 までのフルクタンが検出されており、部位によって蓄積しているフルクタンの重合度の幅が異なっていた。

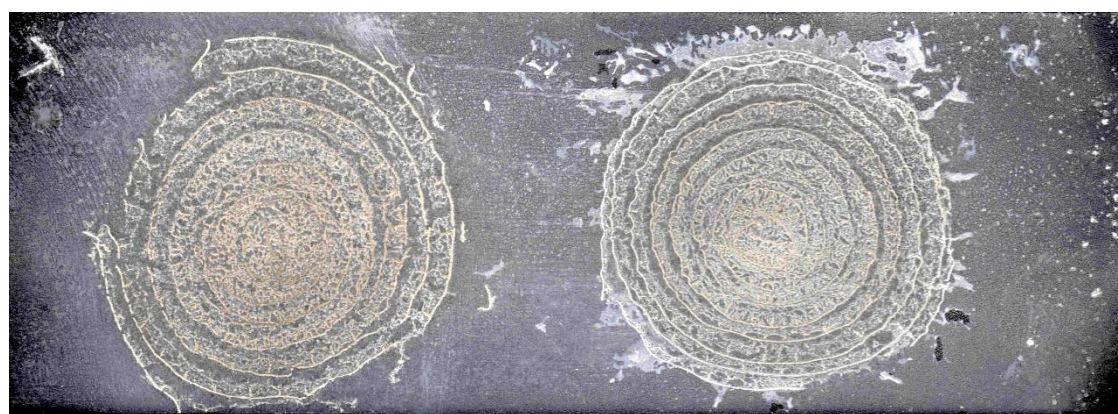
フルクタン分布に関する先行研究では、鱗茎の葉を外側から内側まで 7 分割し、抽出試料のフルクタン含量を薄層クロマトグラフィーとゲル浸透クロマトグラフィーを組み合わせで調査している (Darbyshire and Henry, 1978)。その結果、内側の鱗葉部分は外側よりも相対的にフルク

タン含量が高く、高重合度のフルクタンを多く蓄積していることが示されている。HPLC-ELSDの結果(第 25~26 図)でも同様に内側部分のフルクタン含量が高かったことから、タマネギ鱗茎において、高重合度のフルクタンほど鱗茎中心の鱗葉部分に多く蓄積しているものと考えられる。

MALDI-TOF MSI 解析では、フルクトースやグルコースにあたる単糖類のマススペクトルを検出できなかったのに対し、HPLC-ELSD では、それらが検出できた。先行研究では、MALDI-TOF MS 分析は、マトリックスのフラグメントイオンピークがピークと重複することがあるため、分子量 500 以下の化合物の検出には適していないという報告もある(Zhang et al., 2007)。本研究の MALDI-TOF MSI の結果では、マトリックス由来のフラグメントを検出していた(第 24 図)。したがって、単糖類のピークを検出できなかった理由の 1 つとしてマトリックスが原因なのかもしれない。MALDI-TOF MSI 解析で単糖類を検出するには、マトリックスの種類を変えたり、レーザー強度を高めたりする方法で検出できる可能性があるため、今後より検討していくべき課題である。

本研究では、タマネギ鱗茎のフルクタンの分布や局在性を確認したが、同様の方法を用いて、タマネギに含まれるフルクタン以外の機能性成分であるケルセチン配糖体や含硫化合物の分布解析にも応用できるものと考えられる。近年、食品の機能性成分は広く注目を集めており、機能性成分の視覚的なデータは消費者にアピールするツールとして利用されている。例えば、玄米の場合、糠や胚芽部分には GABA や γ -オリザノールなどの機能性成分が含まれるがヒ素や独特の風味があるために一般消費者には受け入れられにくい一面があった(久後ら, 2016)。機能性成分を一定量残しつつも食味が損なわれないような精米法が民間企業によって確立され、裏付けとなる視覚的なデータとして MALDI-TOF MSI が利用されている報告がある(Zaima et al., 2014)。このように、食品の有用な機能性成分の分布についても MALDI-TOF MSI 解析を用いることで、加工利用分野においても利用価値があるものと考えられる。

また、MALDI-TOF MSI では、農作物の機能性成分だけでなく、残留農薬や有毒物質などヒトに害を与える恐れのある物質の分布を検出するのにも有効である。これまでの研究では、バレイショの有毒物質である α -ソラニンや α -カコニンなどのグリコアルカロイドの分布を明らかにしている報告や、殺菌剤を散布したキュウリの作物内移行を可視化した報告がある(Ha et al., 2012; Taira et al., 2015)。近年では、食品に含まれるアレルゲン対策も重要であることから、アレルゲン分布を把握する試みとして MALDI-TOF MSI による可視化が役立つものと考えられる。以上の観点から、MALDI-TOF MSI 技術は農業や食品分野での未解明な問題の解決にさらに有効活用されることが期待される。



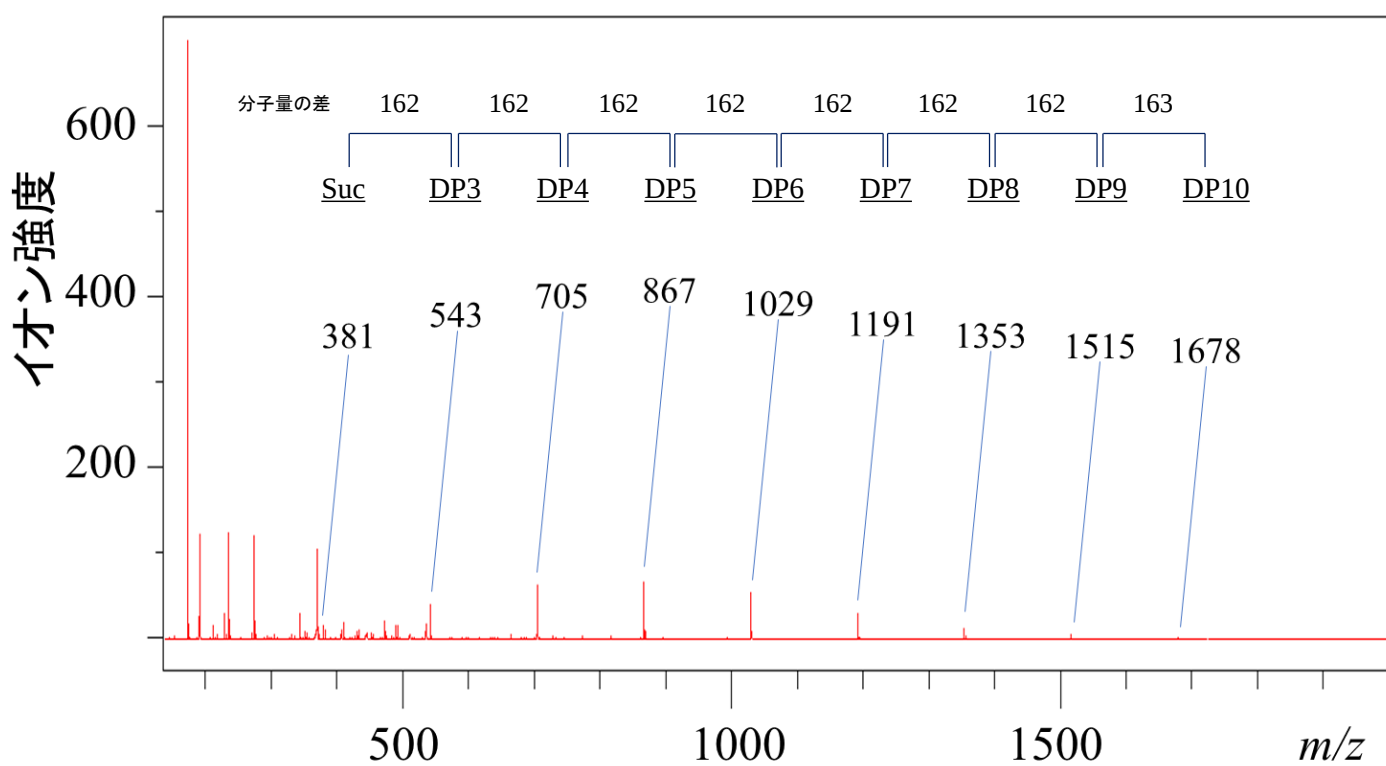
未包埋

CMC包埋

1 cm

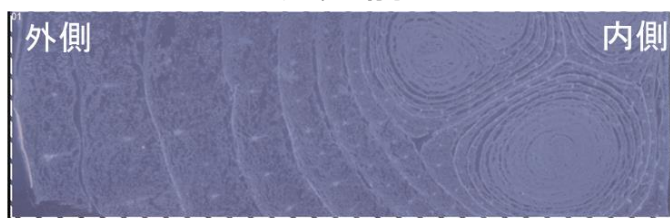
第23図 タマネギ鱗茎(ペコロス)の横断組織切片
未包埋(左図)、CMC包埋(右図)。

-80℃で凍結後、-20℃内でクライオスタットミクロームを用いて厚さ50 μm で切削。
ITOスライドガラスに伸展後、50 mg mL^{-1} DHB溶液を試料面に散布。

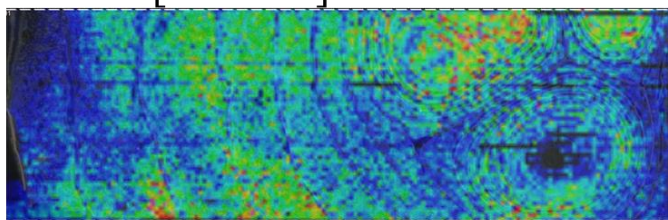


第24図 MALDI-TOF MS/MSにおけるタマネギ鱗茎の
 可用性炭水化物のマススペクトラムの一例.
 m/z 381はスクロース(Suc)、 m/z 543~1678はそれぞれDP3~10のフルクタンを示す.

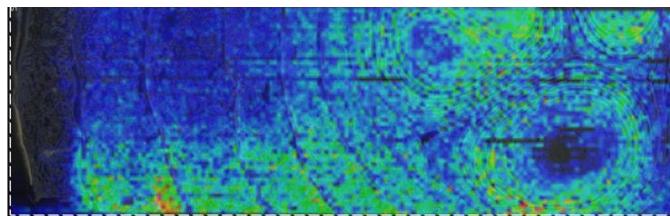
測定前



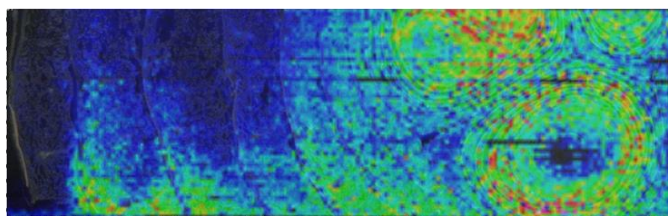
$[\text{Suc} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 381.0$



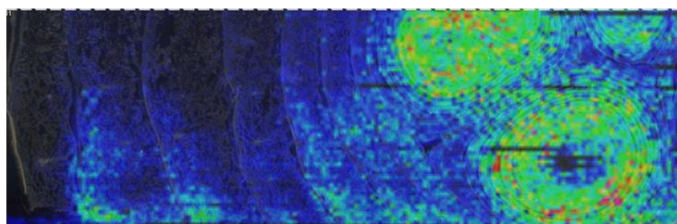
$[\text{DP3} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 543.0$



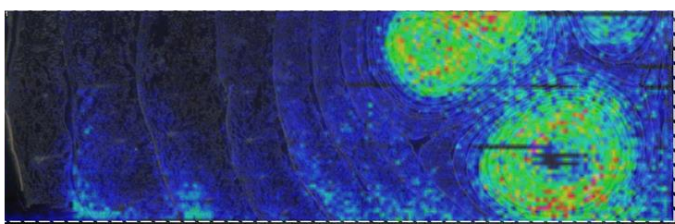
$[\text{DP4} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 705.4$



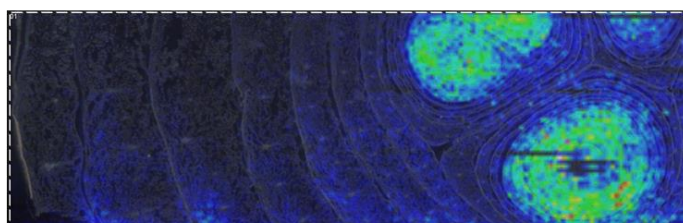
$[\text{DP5} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 867.3$



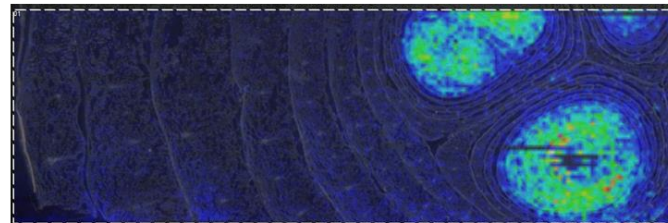
$[\text{DP6} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 1029.3$



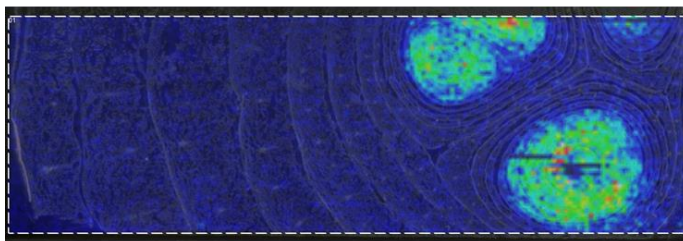
$[\text{DP7} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 1191.3$



$[\text{DP8} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 1353.3$



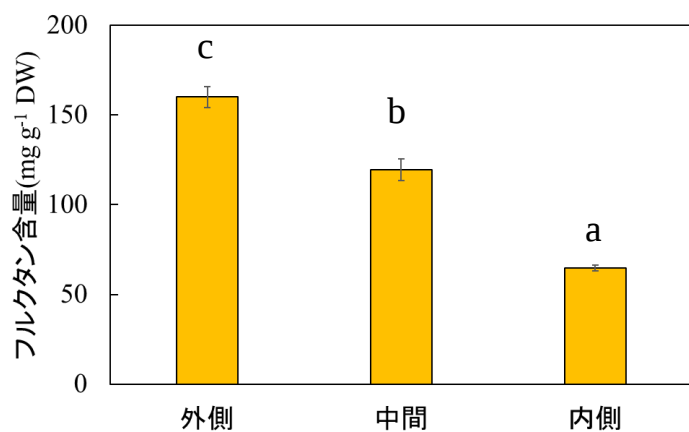
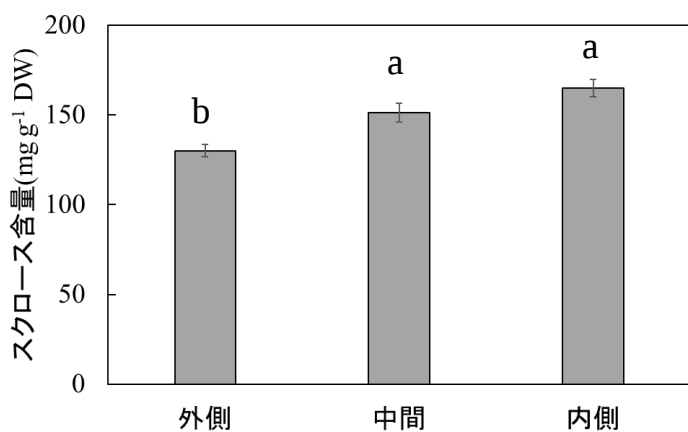
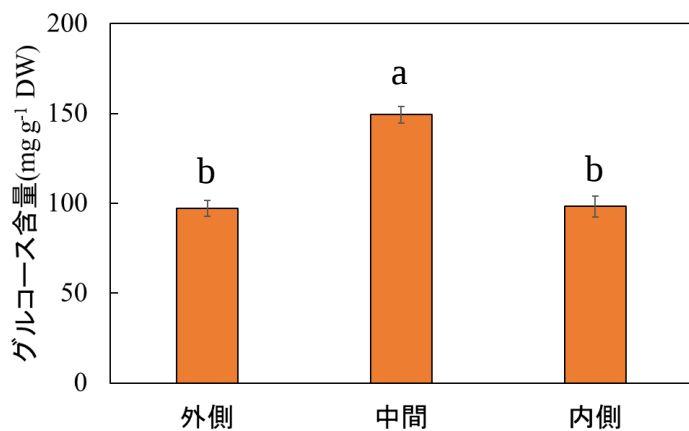
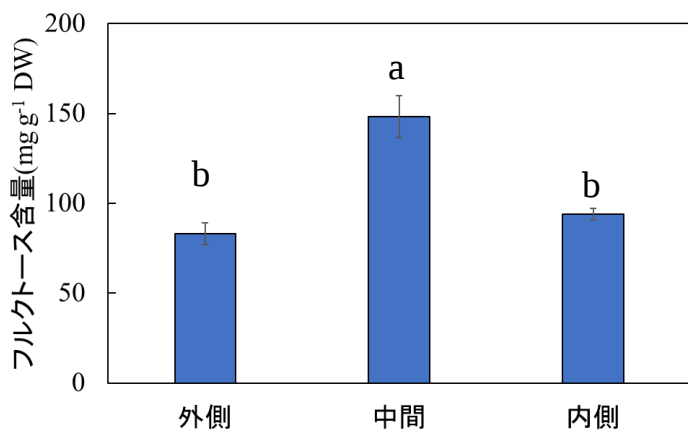
$[\text{DP9} + \text{K}]^+ \quad m/z \ 1515.5$



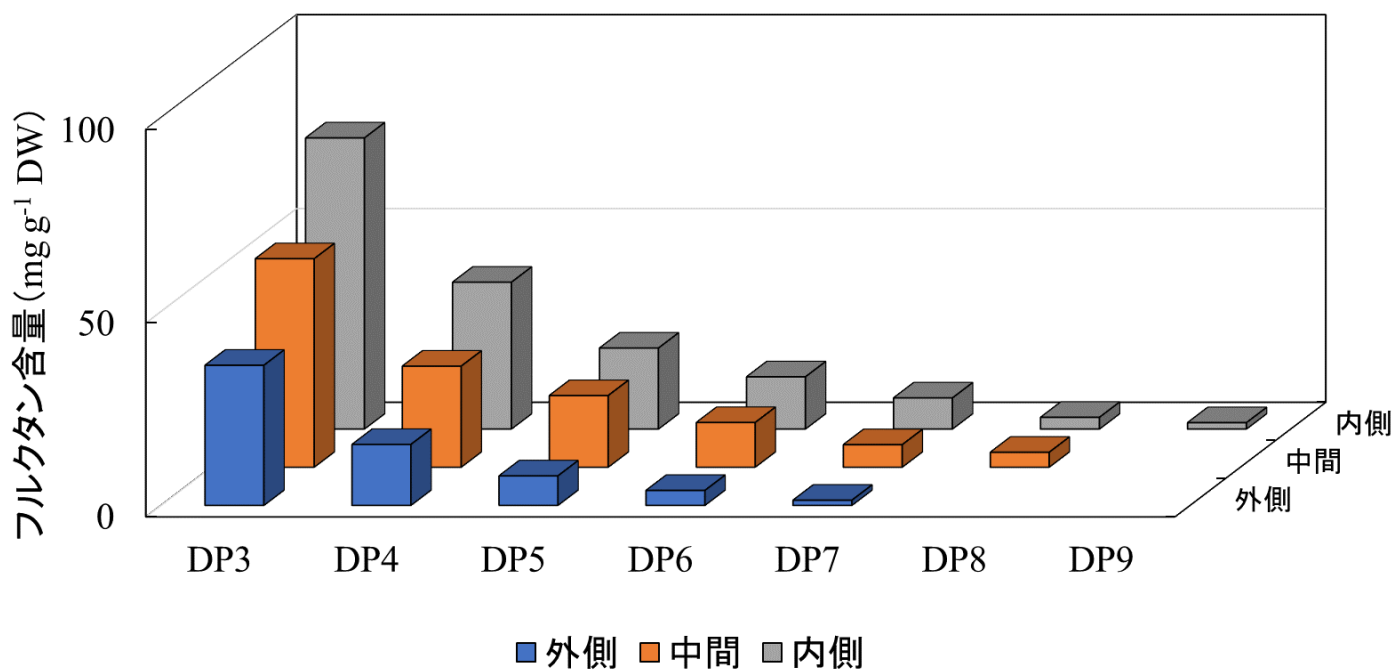
5mm



第25図 MALDI-MSIを用いたタマネギ鳞茎の炭水化物の分布.
カラーバーは、黄緑、黄、赤になるにつれて同一の分子量が高く蓄積していることを示す.



第26図 HPLC-ELSDを用いたタマネギ鱗茎の部位別の炭水化物含量.
異なるアルファベット符号は、Tukeyの多重比較検定で5%水準で部位間に有意差あり.



第27図 HPLC-ELSDに基づくタマネギ鱗茎の部位別のフルクタン含量の差異。
外側:DP3~7、中間:DP3~8、内側:DP3~9のフルクタンが蓄積。

第 5 章 アグロバクテリウムを用いたタマネギ形質転換体作出の試み

第 3 章ではフルクタン代謝に関わる 1-FEH および 6G-FFT について、*N. benthamiana* の葉肉プロトプラストを用いた一過発現を行い、タバコ植物細胞内での活性評価を行った。しかし、実際のタマネギ植物体でもこれらの遺伝子が同様の機能を持っていると言い切ることはできない。フルクタン代謝酵素のタマネギ組織内での活性を正確に評価するためには、調べたい遺伝子の機能を欠失させたタマネギを用いる解析が必要となる。

タマネギは品種によってカルス化やそこからの再分化効率が異なり、効率のよい個体再生系が確立している品種は少ない。本研究ではタマネギの品種ごとに異なるフルクタン代謝について研究していることもあり、研究対象の品種ごとにカルス経由の個体再生系を確立し、さらには遺伝子組換え系の確立も必要になってくると考えられる。そこで本章では、これまで対象として扱ってきた‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’についてカルス経由の再分化個体を作成することを検討するとともに、*Agrobacterium tumefaciens* を用いた組換え体の作出についても検討を行った。

第 1 節 材料および方法

(1) 植物材料およびカルス誘導培地への無菌播種培養

‘北もみじ 200’と‘ポールスター’の種子を不織布袋(お茶パック)に入れ、70%エタノールで 1 分間表面殺菌した。その後、10% (v/v) の次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1.2%)に界面活性剤の Tween 20 を数滴加えたものに種子を浸漬し、25 分間殺菌処理を行った。殺菌処理中、7 分ごとに振とうして、種子全体が殺菌されるようにした。クリーンベンチ内で溶液を捨て、滅菌水で 5 回以上洗浄し、Tanikawa et al., (1998)と Kamata et al., (2011)の方法を参考にして無菌播種した。播種用培地として、0.1 M スクロース、1 g L⁻¹ Bacto Tryptone(BD)、50 μM 4-fluorophenoxyacetic acid (4-FPA, Sigma aldrich)、1 μM N⁶-(2-Isopentyl)adenine (2iP, フナコシ)、2 g L⁻¹ ジェランガム(和光純薬工業)を含むカルス誘導培地(SCC, 第 11 表)を滅菌シャーレに分注して作製した。播種後は、24℃、相対湿度 50%、16 時間日長で培養した。

約 1 か月後、初生根先端組織にできたカルスが十分に大きくなった時点で、黄色いカルスを切り取り、外植体とした。カルスは共存前培養培地(PCO, 第 11 表)に移植し、25℃、相対湿度 50%、暗所で 1 週間培養した。

(2) アグロバクテリウムの前培養・カルスのアグロバクテリウムの感染

形質転換には、バイナリーベクター pIG121-Hm を導入したアグロバクテリウム EHA105 株を使用した(第 28 図)。pIG121-Hm は、pBI101 から作られたベクターコンストラクトであり、ハイグロマイシン耐性遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含んでいる(Jefferson et al., 1987)。EHA105 株は EHA101 株からカナマイシン耐性遺伝子を除いたものである(Hood et al., 1986)。pIG121-Hm のプラスミド溶液を EHA105 株の入った 1.5 mL チューブに加え、氷上で 30 分インキュベートした。インキュベート後、液体窒素に 20 秒浸漬し、37°C のウォーターバスで 5 分間ヒートショックを与えた。その後、900 μ L の YEP 液体培地を加え転倒混和し、28°C で 3 時間振とう培養して、アグロバクテリウムをリカバリーさせた。50 μ g mL⁻¹ のカナマイシンを加えた LB プレートに 100 μ L の大腸菌培養液をコンラージ棒で塗布した。塗布後、28°C で 2~3 日間インキュベートした。その後、プレートにできたシングルコロニーを爪楊枝でつつき、コロニー PCR でプラスミドの保持を確認した。この時、新しい 50 μ g mL⁻¹ のカナマイシンを加えた LB プレートにコロニー PCR で使用したコロニーをストリークして、マスタープレートを作製した。目的の増幅バンドが得られたコロニーを滅菌したスパチュラで回収し、50 μ g mL⁻¹ のカナマイシンを添加した 6 mL の YEP 培地に加え、28°C で 20 時間振とう培養した(200 rpm)。その後、培養液の濃度を分光光度計で測り、OD₆₀₀ の値が 0.5~0.6 になるように、アセトシリンゴン入りの液体共存培地(LCO, 第 11 表)で希釈調整を行ったものをアグロバクテリウムの菌液として用いた。

PCO 培地で培養していたカルスをアグロバクテリウム菌液に 5 分間浸漬した。その後、滅菌したろ紙に置き余分な菌液を除去し、アセトシリンゴン入りの共存培地(SCO, 第 11 表)に置床し、25°C の暗所で 3 日間共存培養した。

(3) 除菌培養・選抜培養・再分化培養

SCO で培養したカルスを除菌培地(LSE(-Hg), 第 11 表)の入った 50 mL チューブで洗浄し、同様の作業を 3 回以上行うことでアグロバクテリウムを洗浄した。除菌後、滅菌したろ紙にカルスを置き、余分な LSE(-Hg)を除去した。その後、カルスを除菌培地(SE(-Hg), 第 11 表)に置床し、25°C の 16 時間日長で 1 週間除菌培地した。

除菌培養後、カルスを選抜培地(SE, 第 11 表)へ移動し、25°C の 16 時間日長で 1~2 か月間選抜培養した。2 週間ごとに新しい選抜培地へ移し替えた。選抜培養後、シュート再分化培地(RE, 第 11 表)にカルスを移し、シュートが出てきたら、発根培地(RT, 第 11 表)に移して、発根を促した。最終的に、再分化植物が十分に大きくなったら、外界に順化させた後、土壌に

鉢上げした。

(4) GUS 遺伝子の導入の確認

RE 培地上で培養していたカルスを用いて、GUS 遺伝子が導入されているかを PCR で確認した。カルスから全核酸を抽出し、GUS 遺伝子のプライマー(第 12 表)を用いてし PCR を行い、電気泳動により PCR 産物の確認を行った。

GUS 染色を用いた確認も行った。RE 培地に置床したカルスを X-Gluc 緩衝液(第 13 表)に浸漬し、37℃で 3 日間インキュベートした。その後、緩衝液を洗浄し、カルスを 5%アガロースゲルで包埋した。包埋したカルスをビブラトームで 70~100 μm の厚さになるよう切片を作製し、顕微鏡観察を行った。遺伝子導入していない対照区として、初生根先端組織に形成したカルスを用いた。

第 2 節 結果および考察

本実験では、‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’の種子各 60 粒を用いて、形質転換体の作出を試みた。カルス誘導した初生根先端組織をアグロバクテリウムに感染させて再分化させた様子を第 29 図に示した。SCC 培地でカルス誘導されたカルスは、‘北もみじ 2000’で 45 個、‘ポールスター’で 25 個であった。しかし、アグロバクテリウムに感染後、除菌・選抜培養を終えた際に再分化した個体は、‘北もみじ 2000’の 1 個体のみであり、それ以外はカルスのままで再分化しなかった(第 29-F 図)。これ以降は、このシュートは生育を継続せず、順化できるまでの大きさの再分化個体を得ることはできなかった。そこで、カルスのままで残っていたものを使って、pBI121-Hm が導入されているかを確かめるため、GUS 遺伝子の発現の確認を行った。

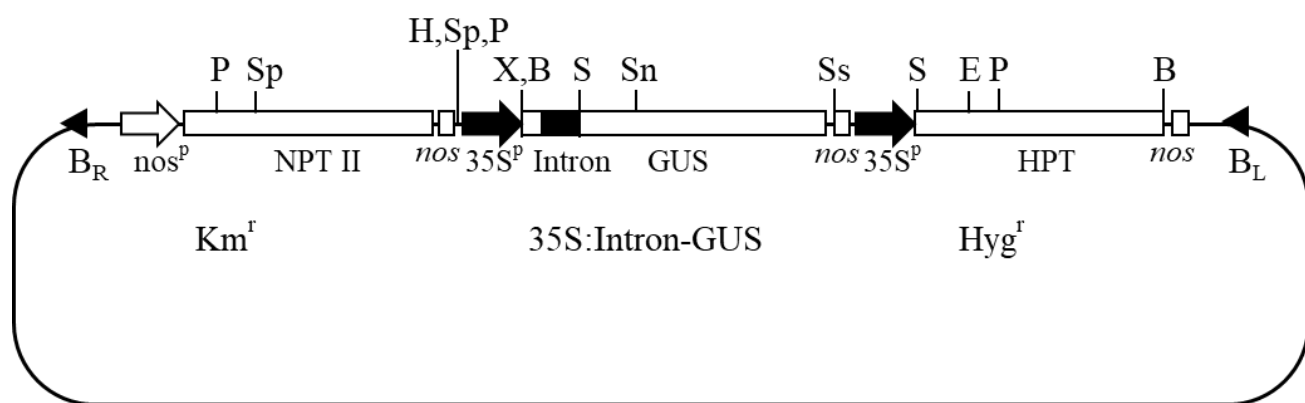
GUS 染色と GUS 遺伝子発現の確認の結果を第 30 図に示した。遺伝子導入区では、約 700 bp にバンドが確認できたのに対し、対照区ではバンドが確認できなかった。GUS 染色した顕微鏡写真では、GUS 発現が起きていると青~水色に染色された組織が観察できるが、対照区では、そのような部分は観察できなかった。一方、遺伝子導入区では、はっきりとしていないが、薄く水色に染色された組織が観察された。RE 培地上のカルスは遺伝子導入されていると考えられるが、その後の再分化ができていない状態となっていると推察される。

ネギ属植物では、ネギ(*Allium fistulosum*)、ワケギ(*Allium wakegi*)、ツリーオニオン(*Allium cepa* var. *proliferum*)およびニンニク(*Allium sativum*)など、カルス経由で再分化を行った報告がある(高橋, 1988; Fridborg, 1971)。特にニンニクでは、カルスからの再分化植物体集団から優良個体が選抜された例もあり、カルス経由の再生植物体を利用した品種改良が実際に行わ

れてきた(Novak, 1980)。一方、タマネギの場合、鱗片葉、成熟種子の接合子胚子葉、未熟胚、発芽種子の初生根先端組織を用いてカルス経由で再分化個体を得られた報告がある(Van der Valk et al., 1992; Dunstan and Short, 1978; 高儀ら, 1996)。しかし、タマネギのカルスは不定胚の形成率が低いことや栽培品種や植物ホルモンによって変異が発生したり、再分化できないことが問題とされている(Novak 1990; Tanikawa et al., 1998)。一方、日本のタマネギ品種では、黄タマネギの‘泉州中甲高黄’や赤タマネギの‘早生湘南レッド’において、カルス経由の再分化が成功した報告がある(Tanikawa et al., 1998; 上西ら, 2001)。Novak (1990)と Tanikawa et al., (1998)では、栽培品種や植物ホルモンによって変異が発生したり再分化できない問題があるとし、今回の実験で用いた‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’も、カルスによる再分化が起こりにくい品種であると考えられる。タマネギだけでなく、バレイショでも同様に再分化が起こりやすい品種とそうではない品種があり(在原ら, 1991)、カルスからの再分化効率は品種依存的なものと考えられる。

タマネギは複数の分げつ芽を持っていることから、この分げつ芽から不定芽を誘導して大量増殖することができると考えられる。このような増殖個体にパーティクルガンで遺伝子導入すれば、フルクタン代謝遺伝子を恒常的に発現させる個体を作ることも可能と考えられる。また、タマネギの葉肉プロトプラストを用いて再分化個体を得ることで同様の形質改変体を得ることができるかもしれない。本章ではタマネギ形質転換体を再生植物体として得ることはできなかった。しかし今後、さらに検討を加えてタマネギ形質転換体を作出することができれば、研究対象の遺伝子機能について、タマネギ植物体内における活性を評価が可能になる。また、形質転換体に乾燥などの環境ストレス、日長変動や温度処理などを与えることで、フルクタン代謝関連遺伝子と環境要因との関連やフルクタン蓄積のメカニズムをさらに明らかにすることができる期待される。同様に、タマネギの重要な要素となる食味や貯蔵性に関するフルクタンの役割を解明し、高機能性タマネギの育種利用に結びつけることができるものと期待される。

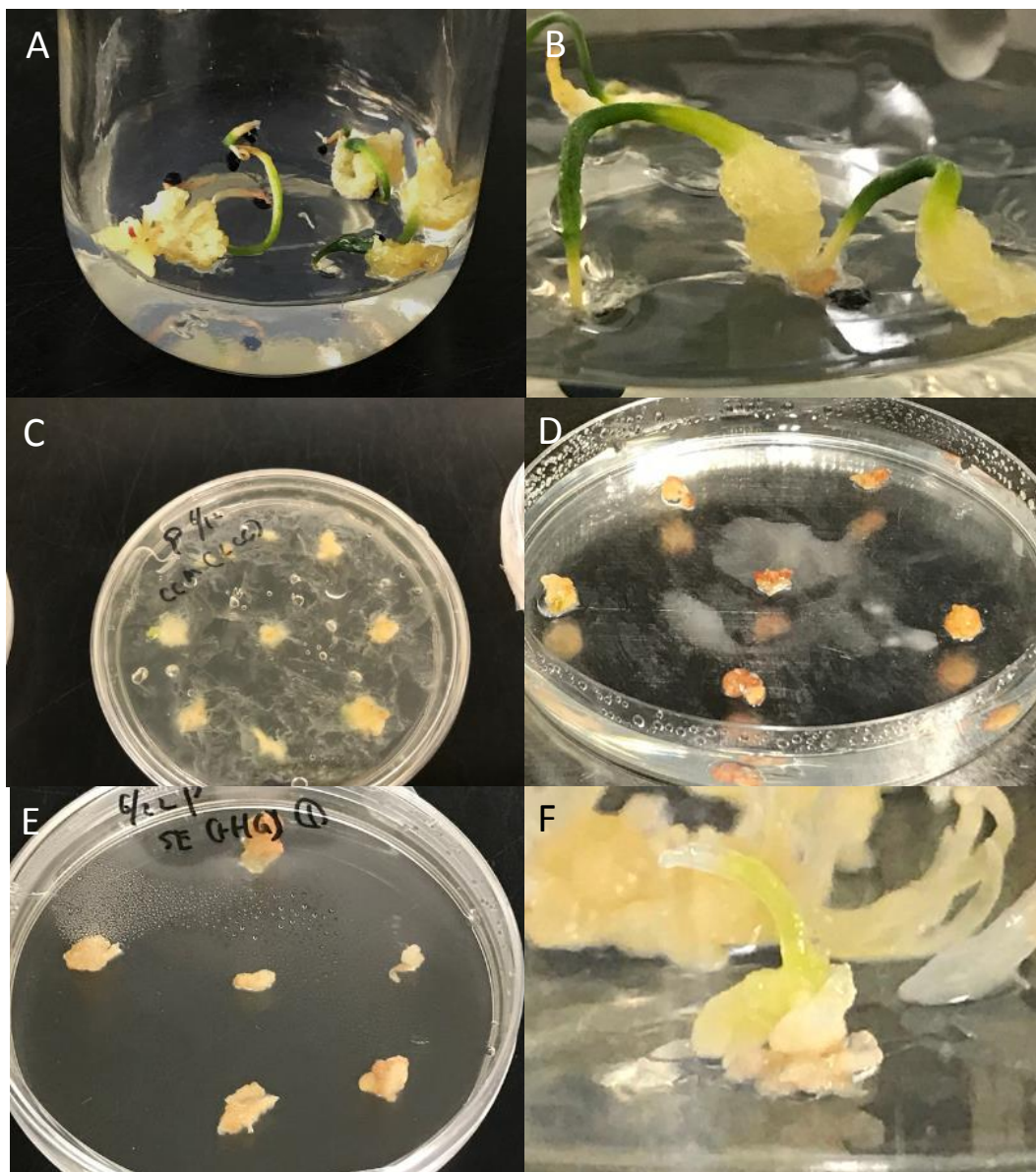
Agrobacterium tumefaciens EHA 105 / pIG121-Hm



pIG121-Hm (pBIH1-IG)

P, Pst I; Sp, Sph I; H, Hind III; X, Xba I; B, BamHI; S, Sal I; Sn, Sna BI; Ss, Sst I(Sac I); E, EcoRI

第28図 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 / pIG121-Hmのベクターコンストラクト.
pIG121-Hmは、カナマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ.

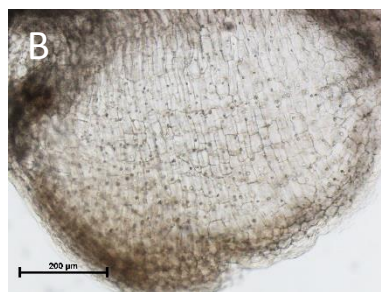
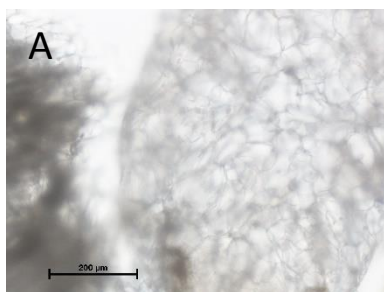


	播種粒数(粒)	カルス形成(個)	SE(-Hg)培地	SE培地	RE培地	RT培地
北もみじ2000	60	45	45	45	1	0
ポールスター	60	25	25	25	0	0

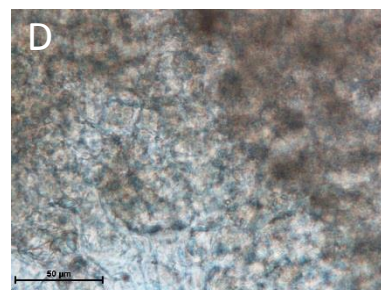
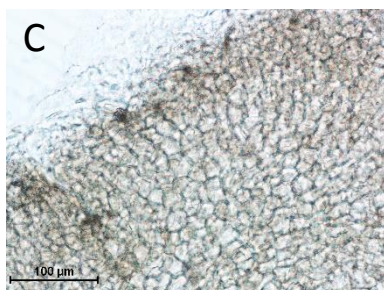
第29図 タマネギの初生根先端組織を利用した形質転換体作出の様子と結果.

A&B:SCC培地でカルス誘導された初生根先端組織, C:SCO培地での共存培養, D:SE(-Hg)培地での除菌培養, E:SE培地での選抜培養, F:RE培地でのシュート再分化の様子.

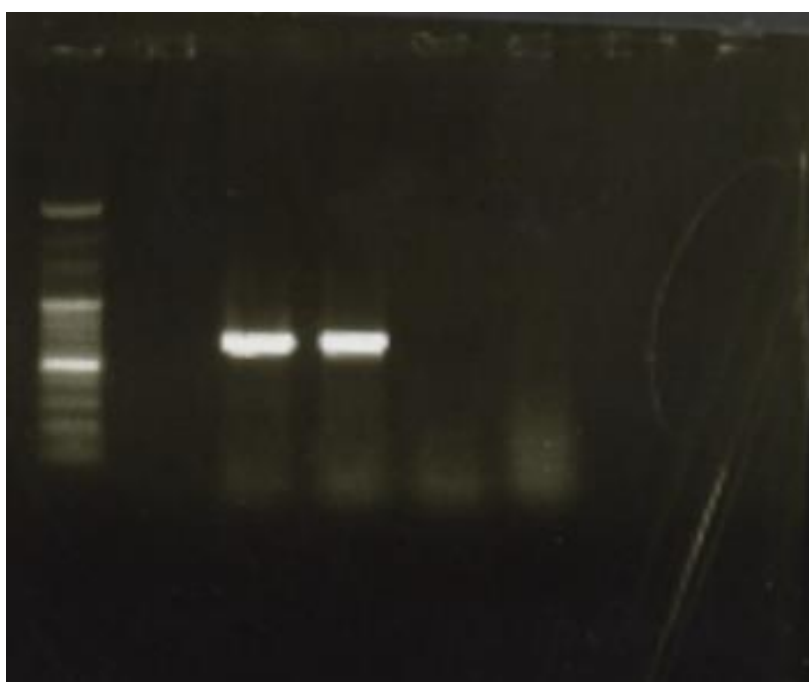
未導入



遺伝子導入



700bp →



100bp
ラダー

遺伝子導入

未導入

北もみじ ポール 北もみじ ポール
2000 スター 2000 スター

第30図 カルスを用いたGUS染色とGUS遺伝子発現の確認.
AおよびB:遺伝子未導入, CおよびD:GUS遺伝子導入.

第11表 第5章で用いた各種培地

培地の種類

SCC	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 2 g L ⁻¹ gellan gum
LCC	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP
PCO	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 20 g L ⁻¹ glucose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 2 g L ⁻¹ gellan gum
SCO	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 20 g L ⁻¹ glucose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 40 mg L ⁻¹ acetosyringone, 2 g L ⁻¹ gellan gum
LCO	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 40 mg L ⁻¹ acetosyringone
SE(-Hg)	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 500 mg L ⁻¹ cefotaxime, 2 g L ⁻¹ gellan gum
LSE(-Hg)	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 500 mg L ⁻¹ cefotaxime
SE	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 50 μM 4-FPA, 1 μM 2iP, 500 mg L ⁻¹ cefotaxime, 50 mg L ⁻¹ hygromycin B, 2 g L ⁻¹ gellan gum
RE	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 1 μM 2iP, 500 mg L ⁻¹ cefotaxime, 50 mg L ⁻¹ hygromycin B, 2 g L ⁻¹ gellan gum
RT	MS salts and vitamins, 0.1 M sucrose, 1g L ⁻¹ casein hydrolysate, 10 mM MES, 2 g L ⁻¹ gellan gum

第12表 GUS遺伝子発現で用いたプライマー

Primer name	Sequence (5'→3')
GUS-Fd	GCAACGTCTGGTATCAGCGC
GUS-Rv	ACGGTTTGTGGTTAATCAGG

第13表 X-Gluc緩衝液

38.3 mM X-Gluc	150 μ L
12.5 mM $K_3Fe(CN)_6$	120 μ L
12.5 mM $K_4Fe(CN)_6$	120 μ L
Triton X-100	9 μ L
滅菌水	X μ L
合計	1000 μ L

第6章 総合考察

タマネギ (*Allium cepa* L.) は、様々な機能性成分を豊富に含む野菜である。代表的な成分として、ルチンやケルセチンなどのポリフェノール、催涙効果や血流促進作用で知られる硫化アリルがある。さらに、水溶性食物繊維であるフルクタンもタマネギの機能性成分として挙げられる。タマネギの育種は収量性や耐病性を向上させることが目標とされてきたが、近年では、ケルセチン含量を高めたタマネギ、辛みに関わる硫化アリル含量が少なく涙がでないタマネギなど、機能性を高めることを目標にした育種も行われている。機能性付加は消費者が意識しやすい形質であり、通常の育種でも分子育種でも、野菜類の機能性向上は着目すべき重要な形質となっている。ケルセチンや硫化アリルに改良を加えたタマネギ品種が作られている一方、これまで、フルクタン含量の改変に関わる成果はほとんどない。フルクタン含量の改変は、食味(甘み)の向上だけでなく、貯蔵性の向上や早晩性の改変などに関連づけることが可能であり、今後のタマネギ品種の展開に有望な着目点であると期待できる。

これまで我々は、タマネギに含まれるフルクタンに着目し、日本国内で栽培される様々なタマネギ品種では鱗茎内のフルクタン含量や組成に顕著な品種間差があることを見出した (Maeda et al., 2017; 第5図)。タマネギはゲノム配列が決定されておらず、分子生物学的な研究は他の野菜品目に比べて遅れている。そのため、タマネギにおけるフルクタン含量の品種間差には、フルクタン合成や分解などフルクタン代謝に関わる遺伝子の差異に関わるのではないかと考えられるが、これまでフルクタン代謝に関わる分子メカニズムの研究はほとんど行われてこなかった。タマネギに含まれるフルクタンの構造から、タマネギのフルクタン合成には主に3種類フルクトース転移酵素 1-SST、6G-FFT、1-FFT が関わり、また、分解にはフルクタン加水分解酵素 1-FEH が関わりと予想されてきた (Fujishima et al., 2005; Benkeblia et al., 2005)。これらのフルクタン代謝酵素の発現量や活性の違いによってフルクタン蓄積が制御されていると考えられる。タマネギの 1-SST、6G-FFT およびインベルターゼについては、遺伝子同定や精製酵素の解析例がわずかにあり、6G-FFT が 1-FFT 様活性を持っていることも報告されている (Shiomi, 1989; Vijn et al., 1997; Fujishima et al., 2005)。一方、フルクタン分解酵素の 1-FEH については全く報告例がなかった。

本研究では、タマネギのフルクタン含量における品種間差を生じる分子メカニズムを明らかにすることを目的に、タマネギ栽培期間中のフルクタン代謝酵素の活性を評価して、それらが品種間差と関わるのかを調べた。また、タマネギで発見されていなかったフルクタン分解酵素 1-FEH を単離し、その機能解析を行った。さらに、タマネギ鱗茎中のフルクタン分布を可視化

しフルクタンの局在性を調査した。局在性を明らかにすることで、鱗茎中のどこでフルクタン蓄積が活発に行われているかを把握できるので、フルクタン合成・分解の代謝メカニズムの手掛かりを得ることができる。以上の実験を通して、フルクタン含量・組成の品種間差の原因を明らかにする基礎的知見を得ることを目指して研究を行った。

これまでのタマネギのフルクタン動態を解析した研究では、鱗茎肥大直後から収穫時までの鱗茎フルクタン含量および酵素活性についての品種別評価 (Shiomi et al., 1997)、また、収穫後の貯蔵中におけるフルクタン含量や酵素活性の評価 (Benkeblia et al., 2005) の報告がある。しかし、定植から収穫まで生育期間全体についてフルクタン含量や酵素活性を調べた研究例はない。本研究において、タマネギ鱗茎の収穫物のフルクタン含量が高い‘北もみじ 2000’と低い‘ポールスター’という、フルクタン含量や組成が異なる 2 品種のタマネギを用いて、定植から収穫までの生育期間全体における鱗茎のフルクタン含量およびフルクタン代謝酵素の活性を測定した。2 品種のフルクタン含量の変化を調べたところ、実生時から鱗茎肥大前までにフルクタン含量の品種間差は現れなかった。そして、フルクタンの蓄積量の違いは、鱗茎肥大開始後から生じて、この違いが収穫期まで維持されていることが分かった (第 8~10 図)。つまり、生育初期すなわち鱗茎肥大開始前の期間では、収穫時の鱗茎フルクタン含量が低い‘ポールスター’も、収穫時の鱗茎フルクタン含量が高い‘北もみじ 2000’と同程度のフルクタン合成能力を有していることが分かった。‘ポールスター’は‘北もみじ 2000’と同程度のフルクタン合成能力を持っているにもかかわらず、収穫時の鱗茎には‘北もみじ 2000’ほどのフルクタンを蓄積できなかったことから、生育初期に可能であったフルクタン蓄積が抑制される何らかの要因が‘ポールスター’の鱗茎肥大前後にあったと考えられる。

生育期間を通したフルクタン代謝酵素の活性変化を調べたところ、鱗茎肥大の間、‘ポールスター’のフルクタン合成酵素活性は‘北もみじ 2000’よりも高かった。この傾向は Maeda et al. (2017) でも示されており、鱗茎の肥大時、鱗茎に蓄積するフルクタン量はフルクタン合成酵素活性の強弱とは関わりを持たないことが示唆される。酵素反応では、基質、反応産物の量、酵素の濃度などが大きく影響する。存在していたフルクタン合成酵素の活性は高いが、‘ポールスター’は‘北もみじ 2000’に比べて実際には反応産物 (フルクタン) を効率良く蓄積できていなかったため、酵素反応に影響する基質量などの要因が‘ポールスター’と‘北もみじ 2000’で異なっていたことが考えられる。一方、‘ポールスター’のフルクタン分解酵素活性は、生育期間のほぼ全体で‘北もみじ 2000’よりも高く、特に鱗茎肥大前の 6 月はインベルターゼと 1-FEH 活性が高かった。しかし、この時期の鱗茎フルクタン含量は 2 品種で同程度に低く、1-FEH 活

性の違いがそれほどフルクタン含量と関連していないようにも思われる。‘ポールスター’が鱗茎肥大前の時期において特に高いインベルターゼ活性および 1-FEH 活性を持つことは、その後の鱗茎肥大期にフルクタンを効率よく蓄積できないことと関わるように思われるが、どのようなメカニズムが関わるのかについては現時点では不明であり、今後さらに検討が必要である。また、本研究では酵素活性解析を粗酵素を用いて行っていた。それぞれのフルクタンの代謝酵素について、精製酵素や異宿主発現系による組換え酵素を用意して、より精密な酵素活性を 2 品種で比較する必要もある。

2017 年の解析では有意差がみられなかったが、2016 年の解析では鱗茎肥大時期における鱗茎中のスクロース含量は‘北もみじ 2000’が‘ポールスター’よりも高かった。また、葉身部の解析は 2017 年のみであるが、葉身内の単糖およびフルクタン含量の解析の結果、葉身でも‘北もみじ 2000’のスクロース含量は‘ポールスター’でより高かった。このことから、葉身や鱗茎のスクロースの量も鱗茎肥大中のフルクタン蓄積に大きく関わりと考えられる。フルクタンの合成はスクロース量と 1-SST 活性が律速因子といわれている (Kooiker et al., 2013)。したがって、2 品種のフルクタン蓄積の品種間差を生じるメカニズムを明らかにするためには、フルクタンだけでなく、スクロースの蓄積に関わる遺伝子、スクロース代謝遺伝子にも注目する必要がある。タマネギではスクローストランスポーターやフルクタン合成に関わる転写因子の研究は進んでいない。これらの遺伝子の解析も行うことで、フルクタン代謝の分子メカニズムを明らかにできるのではないかと考えられる。

これまで多くのタマネギ研究は食用である鱗茎のみを材料として扱ってきたが、本研究では、地上部組織である葉身のフルクタン含量の解析も行った。その結果、どちらの品種でも、生育初期に一時的にフルクタンが高く蓄積し、鱗茎肥大開始前まで減少して、鱗茎肥大開始に伴ってフルクタンは検出されなくなった(第 11~12 図)。生育前半のフルクタンの蓄積は、鱗茎部分を用いた解析でも同様にみられた。鱗茎が肥大しはじめる生育後半では、葉身部でフルクタンは検出されず、もっぱら鱗茎部分のみに検出されたことから、鱗茎の形成を境に、葉身部分はソース器官としての役割をやめて、シンク器官である葉鞘基部(鱗茎)に炭水化物を転流する動きを強めると予想される。鱗茎を形成しないネギ (*Allium fistulosum*) でも、栽培期間中の葉身内フルクタン含量が生育初期に一時的に増加し、減少ののちにまた蓄積することが示されている (Hang et al., 2004; Yaguchi et al., 2008)。定植直後にフルクタンが一時的に増加することは、ネギ属植物で一般的な現象と考えられ、エネルギーを多く必要となるであろう葉身の分げつが活発になる時期に備えてフルクタンを多く蓄積すると考えられる。また、Yaguchi et al. (2008) では、ネギ (*Allium fistulosum*) にタマネギの各染色体を導入した雑種ネギを用いた研

究があり、野生のネギに比べてフルクタンを多く蓄積するようになった雑種ネギにも、フルクタンが蓄積する時期に葉鞘基部の肥大は起こっていなかった。すなわち、ネギにおいて、フルクタンの蓄積の量と葉鞘基部の肥大とは関連していないと考えられる。タマネギは長日条件に应答して鱗茎肥大を開始するが、ネギでも極度の長日条件を与えると葉鞘基部が肥大することがある(引用)。タマネギでは葉鞘基部の肥大とフルクタンの蓄積が連動していると思われるが、ネギではそのようなつながりが存在しないのかもしれない。

本研究では、タマネギで単離されていなかった 1-FEH を同定することができた。タバコ葉肉プロトプラストを用いた Onion9132 の機能解析では、9132 は基質の 1-kestose、ネオkestose、1&6G-kestotetraose を分解し、フルクタンのフルクトース-フルクトース間の β (2 $\rightarrow$ 1) 結合だけでなく、フルクトース-グルコース間の β (2 $\rightarrow$ 6) 結合も分解していた。このことから、Onion9132 は、最近アスパラガスで報告された 6G&1-FEH(Ueno et al., 2018)と同様の活性を持ったフルクタン分解酵素であると考えられる。他のフルクタン代謝酵素遺伝子との系統解析の結果、1-FEH 活性を示した Onion9132 は、液胞インベルターゼや 1-SST などのフルクタン転移酵素と同じクレードに分かれた(第 14~16 図)。これまで、植物でみつがっている FEH は細胞壁型インベルターゼから進化したものであるとされており、系統解析でも FEH は細胞壁型インベルターゼが含まれるクレードに分かれる。したがって、Onion9132 は液胞型インベルターゼから進化したことが示唆される初めてのフルクタン加水分解酵素である。液胞型インベルターゼがそうであるように、フルクタン転移酵素は液胞に局在すると考えられている。Onion9132 も液胞に局在することが予想されるが、プロトプラストにおける蛍光観察では Onion9132 の局在性ははっきり判別できなかった。今後、より詳細な画像が得られる共焦点顕微鏡あるいは免疫電子顕微鏡観察なども行い、Onion9132 の局在性を詳細に調査する必要がある。

タマネギ組織に含まれるフルクタン分布の解析は、Darbyshire and Henry (1978) の報告以降行われていない。その理由として、タマネギの葉(普通葉、保護葉、肥厚葉、鱗葉を含む)の枚数は品種により様々であり、気象条件や生育環境などの環境要因の影響を受けるために、鱗茎内のフルクタン分布の結果に一定性を示しにくかったことが考えられる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析装置イメージング(MALDI-TOF MSI)では、組織内の位置関係を崩さずに、複数の生体分子や代謝物があつた場所を同時に可視化することができる。MALDI-TOF MSI でタマネギ鱗茎の組織切片のイメージング解析を行ったところ、スクロースおよび DP3~4 のフルクタンは鱗茎全体に分布し、DP5~9 のフルクタンは重合度が増加するにつれて中心の鱗葉部分のみに蓄積分布していることが示された(第 25 図)。

HPLC-ELSD で鱗茎の部位別のフルクタン含量を測定したところ、MALDI-TOF MSI 解析の結果と同様であり、また、先行研究の結果とも一致していた (Darbyshire and Henry, 1978)。このことから、鱗茎では中心で特に高重合度のフルクタンが蓄積していることが示された。鱗茎の中心には分裂組織があり、新しい葉の形成など成長が活発な部位である。フルクタンの蓄積は低温ストレスからの細胞の保護に関わるともいわれることから、分裂組織や新しい葉の成長や保護に高重合度のフルクタンが貢献しているのかもしれない。一方、MALDI-TOF MSI では、フルクトースやグルコースにあたる単糖類が検出できなかった。この理由の 1 つとしてマトリックスが原因なのかもしれない。先行研究では、マトリックスのフラグメントイオンピークがピークと重複することがあるため、分子量 500 以下の化合物の検出には適していないという報告もある (Zhang et al., 2007)。MALDI-TOF MSI 解析で単糖類を検出するには、マトリックスの種類を変えたり、レーザー強度を高めたりする方法で検出できる可能性があるため、今後より精査する必要がある。

N. benthamiana の葉肉プロトプラストを用いた一過発現系を用いて、タバコ細胞内でタマネギのフルクタン代謝遺伝子の活性評価を行った。しかし、タマネギの様々な生理現象にフルクタン代謝がどれほど関わるのかを明らかにするためには、実際のタマネギ植物体を使った解析が必要であり、フルクタン代謝遺伝子を欠失させたタマネギ系統の作出も有用なアプローチである。しかし、タマネギの遺伝子組換えの成功例はわずかであり、技術的に困難であることが考えられる。本研究では、*Agrobacterium tumefaciens* を用いて遺伝子組換えタマネギを作出するためには、‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’においてカルスからの効率の良い再分化系を確立することが必須と考えた。いくつかの検討を行ったが、結果として、‘北もみじ 2000’の 1 個体のみで再分化したシュートが得られ、どちらの品種でも再分化効率が非常に低いことが分かった。再分化せずカルスのままで残っていたものを使って外来遺伝子 (GUS 遺伝子) の発現の確認を行ったところ、遺伝子導入されていることが確認されたことから、組換え体が効率よく得られなかったのは再分化効率が低いためであると考えられた。そもそも、タマネギはカルス経由の再分化や不定胚形成の効率が低いとされるが (Novak 1990; Tanikawa et al., 1998)、今回用いた‘北もみじ 2000’と‘ポールスター’も再分化が起こりにくい品種であると考えられる。遺伝子組換え系を確立するには、再分化しやすい品種を用いたり、カルスからの再分化率を向上させたりなどいくつかの改良を加える必要がある。遺伝子組換え系を確立することができれば、フルクタン代謝関連遺伝子と環境要因との関連やフルクタン蓄積のメカニズムをさらに明らかにすることができ、育種利用への応用の幅が大きく広がる。

本研究より、フルクタン含量の異なる 2 品種のタマネギを用いて生育期間全体の糖含量や

フルクタン代謝酵素活性を調べたところ、収穫直前までフルクタン含量の品種間差が生じないことが分かり、収穫鱗茎でみられるフルクタン量の品種間差には、鱗茎肥大直前のフルクタン分解酵素活性、インベルターゼ活性およびスクロースの蓄積が影響している可能性が示唆された。また、タマネギで初めてとなる、6G&1-FEH 活性を持つ遺伝子を単離・同定した。タマネギは、世界で多く消費されている野菜の 1 つであり、その中でも北海道は、日本のタマネギの一大産地である。本研究で得られた知見がタマネギ育種および食品開発の礎となり、タマネギを通して、北海道をはじめ国内はもとより世界の消費者の健康増進に貢献することを願いたい。

摘 要

- ・ 本研究では、タマネギのフルクタン含量における品種間差を生じる分子メカニズムを明らかにすることを目的に、タマネギ栽培期間中のフルクタン代謝酵素の活性を評価して、それらが品種間差と関わるのかを調べた。また、タマネギで発見されていなかったフルクタン分解酵素 1-FEH を単離し、その機能解析を行った。
- ・ フルクタン含量や組成が異なる 2 品種のタマネギ（‘北もみじ 2000’および‘ポールスター’）を用いて、定植から収穫までの生育期間全体における鱗茎の単糖およびフルクタン含量を調べた。その結果、収穫時に鱗茎のフルクタン含量が低い‘ポールスター’でも、鱗茎肥大前には‘北もみじ 2000’と同程度のフルクタンを鱗茎に蓄積しており、重合度（DP）にも違いがほとんどなかった。鱗茎肥大開始後、鱗茎のフルクタン含量の蓄積量の違いがあらわれ、それが収穫期まで維持されて品種間差を生じていることが分かった。
- ・ 地下部の鱗茎組織の解析に加えて、地上部の葉身組織のフルクタン含量も調べた。その結果、葉身でも生育初期に一時的にフルクタンが高く蓄積していたが、鱗茎肥大開始に伴って、フルクタンは検出されなくなった。生育期間を通じて、葉身のフルクタン含量に品種間差はみられなかった。しかし、鱗茎肥大時期の葉身のスクロース含量は‘ポールスター’よりも‘北もみじ 2000’で高かった。‘北もみじ 2000’はより多くのスクロースを地下部の鱗茎へ転流させることができると考えられ、このことが鱗茎形成時の鱗茎フルクタン含量の品種間差に関わる可能性が示唆された。
- ・ 鱗茎のフルクタン合成・分解酵素の活性を 2 品種で比較した。鱗茎肥大の間、解析したすべてのフルクタン合成酵素において、‘ポールスター’の酵素活性は‘北もみじ 2000’よりも高かった。このことから、鱗茎の肥大時、鱗茎に蓄積するフルクタン量はフルクタン合成酵素活性の強弱とは関わらないことが示唆され、酵素反応に影響する基質の量などの要因が‘ポールスター’と‘北もみじ 2000’で異なっていたことが考えられる。一方、‘ポールスター’のフルクタン分解酵素活性は、生育期間のほぼ全体で‘北もみじ 2000’よりも高く、特に鱗茎肥大前の 6 月は特にインベルターゼと 1-FEH 活性が高かった。これらのことから、フルクタン含量の品種間差には、フルクタン合成酵素活性よりもフルクタン分解酵素活性の高さが関わり、また、鱗茎肥大開始前のフルクタン合成の基質量も影響を及ぼすと考えられた。

- タマネギで未単離の 1-FEH の単離・同定を目的に、他の作物に含まれるフルクタン代謝酵素遺伝子を参考にクローニングを行ったところ、1-FEH 候補として Onion9132 の全長配列を決定した。*N. benthamiana* の葉肉プロトプラストを用いた Onion9132 の機能解析では、9132 は基質の 1-kestose、neo-kestose、1&6G-kestotetraose を分解し、フルクトースと分解産物を生成していた。また、フルクタンのフルクトース-フルクトース間の β (2 $\rightarrow$ 1) 結合だけでなく、フルクトース-グルコース間の β (2 $\rightarrow$ 6) 結合も分解していたことから、6G&1-FEH 活性をもつことを示すことができた。系統樹解析の結果、Onion9132 は液胞型インベルターゼ様のフルクタン加水分解酵素であることが分かり、これまで植物で見つかっている FEH とは異なる進化を経ていることが示唆された。
- MALDI-TOF MS Imaging を用いてタマネギ鱗茎の組織切片のイメージング解析を行ったところ、スクロースと DP3 $\sim$ 9 のフルクタン分布の可視化ができた。スクロースおよび DP3 $\sim$ 4 のフルクタンは、鱗茎全体に分布していた。一方、DP5 $\sim$ 9 のフルクタンは重合度が増加するにつれて中心の鱗葉部分のみに蓄積分布し、DP によってフルクタンが局在することが確認できた。HPLC-ELSD で鱗茎の部位別でフルクタン含量を調査したところ、内側の鱗葉部分が外側と比較して相対的にフルクタン含量が高く、高重合度のフルクタンを蓄積していたことから、HPLC-ELSD の解析結果が MALDI-MSI の結果を裏付けた。
- フルクタン代謝酵素遺伝子の機能をタマネギ植物体でも確認するため、初生根先端組織のカルス経路での再分化個体の作出および *Agrobacterium tumefaciens* を用いた組換えタマネギの作出を検討した。初生根先端組織部分でカルスが形成されたため、アグロバクテリウムに感染させて再分化を試みた。除菌・選抜培養を終えて再分化をうながしたが、‘北もみじ 2000’で 1 個体のみがシュートを発生し、ほとんどのカルスから再分化個体を得ることはできなかった。シュート再生がみられなかったカルスを用いて導入した GUS 遺伝子の発現確認を行ったところ、遺伝子導入が確認できた。したがって、アグロバクテリウム感染によって外来遺伝子が挿入されているが、カルスからの再分化ができずに遺伝子組換え体を得られないことが分かった。

参考文献

- Baumgartner, S., Dax, T.G., Praznik, W., Falk, H., 2000. Characterization of the high-molecular weight fructan isolated from garlic (*Allium sativum* L.). Carbohydr. Res. 328, 177–183.
- Bencivenni, M., Faccini, A., Zecchi, R., Boscaro, F., Moneti, G., Dossena, A., Sforza, S., 2014. Electrospray MS and MALDI imaging show that non-specific lipid-transfer proteins (LTPs) in tomato are present as several isoforms and are concentrated in seeds. J. Mass Spectrom. 49, 1264–1271.
- Benkeblia, N., Onodera, S., Shiomi, N., 2005. Variation in 1-fructo-exohydrolase (1-FEH) and 1-kestose-hydrolysing (1-KH) activities and fructo-oligosaccharide (FOS) status in onion bulbs. Influence of temperature and storage time. J Sci Food Agric. 85, 227–234.
- Boughton, B.A., Thinagaran, D., Sarabia, D., Bacic, A., Roessner, U., 2015. Mass spectrometry imaging for plant biology: a review. Phytochem. Rev. 15, 445–488.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., Henrissat, B., 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic Acids Res. 37, D233–238.
- Cimini, S., Locato, V., Vergauwen, R., Paradiso, A., Cecchini, C., Vandenpoel, L., Verspreet, J., Courtin, C. M., D'Egidio, M. G., Van den Ende, W., De Gara, L., 2015. Fructan biosynthesis and degradation as part of plant metabolism controlling sugar fluxes during durum wheat kernel maturation. Front. Plant Sci. 6, 89.
- Cortés-Romero, C., Martínez-Hernández, A., Mellado-Mojica, E., López, M. G., Simpson, J., 2012. Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. PLoS One 7, e35878.
- Darbyshire, B., Henry, R.J., 1978. The distribution of fructans in onion. New Phytol. 81, 29–34.
- Downes, K., Terry, L.A., 2010. A new acetonitrile-free mobile phase method for LC-ELSD quantification of fructooligosaccharides in onion (*Allium cepa* L.). Talanta 82, 118–124.
- Dunstan, D.I., Short, K.C., 1978. Shoot production from onion callus tissue cultures. Scientia

Horticulturae. 9, 99–110.

- Enomoto, H., Sato, K., Miyamoto, K., Ohtsuka, A., Yamane, H., 2018. Distribution analysis of anthocyanins, sugars, and organic acids in strawberry fruits using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4958–4965.
- Fridborg, G., 1971. Growth and Organogenesis in Tissue Cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. *Physiol. Plant.* 25, 436–440.
- Fujishima, M., Sakai, H., Ueno, K., Takahashi, N., Onodera, S., Benkeblia, N., Shiomi, N., 2005. Purification and characterization of a fructosyltransferase from onion bulbs and its key role in the synthesis of fructo-oligosaccharides in vivo. *New Phytol.* 165, 513–524.
- Gibson, G.R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401–1412.
- Ha, M., Kwak, J.H., Kim, Y., Zee, O.P., 2012. Direct analysis for the distribution of toxic glycoalkaloids in potato tuber tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging. *Food Chem.* 133, 1155–1162.
- Hang, T.T., Shigyo, M., Yaguchi, S., Yamauchi, N., Tashiro, Y., 2004. Effect of single alien chromosome from shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) on carbohydrate production in leaf blade of bunching onion (*A. fistulosum* L.). *Genes Genet. Syst.* 79, 345–350.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2379–2383.
- Hood, E.E., Halmer, G.L., Fraley, R. T., Chilton, M. D., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291–1301.
- Horikawa, K., Hirama, T., Shimura, H., Jitsuyama, J., Suzuki T., 2019. Visualization of soluble carbohydrate distribution in apple fruit flesh utilizing MALDI–TOF MS imaging. *Plant Science.* 278, 107–112.

- Jaime, L., Martínez, F., Martín-Cabrejas, M.A., Mollá, E., López-Andréu, F. J., Waldron, K.W., Esteban, R.M., 2000. Study of total fructan and fructooligosaccharides content in different onion tissues. *J. Sci. Food Agric.* 81, 177–182.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6, 3901–3907.
- Jin, Y., Fei, M., Rosenquist, S., Jin, L., Gohil, S., Sandström, C., Olsson, H., Persson, C., Höglund, A.S., Fransson, G., Ruan, Y., Åman, P., Jansson, C., Liu, C., Andersson, R., Sun, C., 2017. A Dual-promoter gene orchestrates the sucrose-coordinated synthesis of starch and fructan in barley. *Mol. Plant* 10, 1556–1570.
- Kamata, Y., Masamura, N., Miyazaki, A., Nagata T., 2011. A novel autofluorescence-based selection of calli amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Biotechnol. (Tokyo)*. 28, 361–371.
- Kaspar, S., Peukert, M., Svatos, A., Matros, A., Mock, H.P., 2011. MALDI-imaging mass spectrometry – an emerging technique in plant biology, *Proteomics*. 11, 1840–1850.
- Kawakami, A., Yoshida, M., 2005. Fructan:fructan 1-fructosyltransferase, a key enzyme for biosynthesis of graminan oligomers in hardened wheat. *Planta*. 223: 90–104
- Kawakami, A., Yoshida, M., Van den Ende, W., 2005. 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.
- Kooiker, M., Drenth, J., Glassop, D., McIntyre, C.L., Xue, G.P., 2013. TaMYB13-1, a R2R3 MYB transcription factor, regulates the fructan synthetic pathway and contributes to enhanced fructan accumulation in bread wheat. *J. Exp. Bot.* 64, 3681–3696.
- Kriegsmann, J., Kriegsmann, M., Casadonte, R., 2015. MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: a valuable tool for cancer diagnostics (review), *Int. J.Oncol.* 4, 893–906.
- López, M.G., Urías-Silvas, J.E., 2007. Agave fructans as prebiotics. in Shiomi, N., Benkeblia, N., Onodera, S.(eds.), *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*. Trivandrum,

Kerala. Research Signpost. 297–310.

- Maeda, T., Watanabe, A., Wambrauw, D.Z., Osanai, S., Honda, K., Oku, S., Shimura, H., Suzuki, T., Yamasaki, A., Okabe, Y., Ueno, K., Onodera, S., 2017. Analysis of varietal differences in the fructo-oligosaccharide accumulation profile among onion (*Allium cepa* L.) cultivars grown by spring-sown cultivation. *Hortic. J.* 86, 501–510.
- Mancilla-Margalli, N.A., López, M.G., 2006. Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasylirion Species. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7832–7839.
- Mitsuhara, I., Ugaki, M., Hirochika, H., Ohshima, M., Murakami, T., Gotoh, Y., Katayose, Y., Nakamura, S., Honkura, R., Nishimiya, S., Ueno, K., Mochizuki, A., Tanimoto, H., Tsugawa, H., Otsuki, Y., Ohashi, Y., 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37, 49–59.
- Nagai, A., Yamamoto, T., Wariishi, H., 2012. Identification of fructo- and malto-oligosaccharides in cured tobacco leaves (*Nicotiana tabacum*). *J. Agric. Food Chem.* 60, 6606–6612.
- Nakamura, J., Morikawa-Ichinose, T., Fujimura, Y., Hayakawa, E., Takahashi, K., Ishii, T., Miura, D., Wariishi, H., 2017. Spatially resolved metabolic distribution for unraveling the physiological change and responses in tomato fruit using matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry imaging (MALDI–MSI). *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 1697–1706.
- Novak, F.J., 1980. Phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *Allium sativum* L. *Plant Breed.* 84, 250–260.
- Novak, F.J., 1990. *Allium* Tissue Culture. P233-250. In: Rabinowitch, HD., Brewster, JL (eds.). *Onions and Allied Crops*, Vol I, CDC Press, Boca Raton, Florida.
- Peukert, M., Thiel, J., Peshev, D., Weschke, W., Van den Ende, W., Mock, HP., Matroša, A., 2014. Spatio-temporal dynamics of fructan metabolism in developing barley grains. *Plant Cell.* 26, 3728–3744.
- Platel, K., Srinivasan, K., 2016. Bioavailability of micronutrients from plant foods: an update. *Crit.*

Rev. Food Sci. Nutr. 56, 1608–1619.

Ritsema, T, Smeekens, S., 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. Curr. Opin. Plant Biol. 6, 223–230.

Shiomi, N., 1982. Purification and characterisation of 1^F-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Carbohydrate Research. 99, 157–169.

Shiomi, N., 1989. Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan in liliaceous plants. J. Plant Physiol. 134, 151–155.

Shiomi, N., 1993. Structure of fructopolysaccharide (asparagosin) from roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). New Phytol. 123, 263–270.

Shiomi, N., Onodera, S., Sakai, H., 1997. Fructo-oligosaccharide content and fructosyltransferase activity during growth of onion bulbs. New Phytol. 136, 105–113.

Shiomi, N., Ueno, K., 2004. Cloning and expression of genes encoding fructosyltransferases from higher plants. J. Appl. Glycosci. 51, 177–183.

Shiomi, N., Benkeblia, N., Onodera, S., 2005. The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: A comprehensive review. J. Appl. Glycosci. 52, 121–127.

Suzuki, T., Maeda, T., Nomura, S., Suzuki, M., Grant, G., Sporns, P., 2011. Rapid analysis of fructans and comparison of fructan profiles in several different types of asparagus storage roots using MALDI–TOF MS. J. Hort. Sci. Biotechnol. 86, 210–216.

Suzuki, T., Maeda, T., Grant, S., Grant, G., Sporns, P., 2013. Confirmation of fructans biosynthesized in vitro from [1-¹³C] glucose in asparagus tissues using MALDI–TOF MS and ESI–MS. J. Plant Physiol. 170, 715–722.

Taira, S., Tokai, M., Kaneko, D., Katano, H., Kawamura-Konishi, Y., 2015. Mass spectrometry imaging analysis of location of procymidone in cucumber samples. J. Agric. Food Chem. 63, 6109–6112.

Tanikawa, T., Takagi, M., Ichii, M., 1998. Varietal differences in plant regeneration from solid

- and suspension cultures in onion (*Allium cepa* L.). J. Japan. Soc. Hort. Sci. 67, 856-861.
- Ueno, K., Onodera, S., Kawakami, A., Yoshida, M., Shiomi, N., 2005. Molecular characterization and expression of a cDNA encoding fructan:fructan 6^G-fructosyltransferase from asparagus (*Asparagus officinalis*). New Phytologist 165, 813–824.
- Ueno, K., Sonoda, T., Yoshida, M., Shiomi, N., Onodera, S., 2018. Purification, characterization, and functional analysis of a novel 6G&1-FEH mainly hydrolyzing neokestose from asparagus. J. Exp. Bot. 69, 4295–4308
- Vågen, I. M., Slimestad, R. 2008. Amount of characteristic compounds in 15 cultivars of onion (*Allium cepa* L.) in controlled field trials. J. Sci. Food Agric. 88: 404–411
- Van Arkel, J., Sévenier, R., Hakkert, J.C., Bouwmeester, H.J., Koops, A.J., van der Meer, I.M., 2013. Tailor-made fructan synthesis in plants: a review. Carbohydr. Polym. 93, 48–56
- Van den Ende, W., Michiels, A., Van Wonterghem, D., Clerens, S.P., De Roover, J., Van Laere, A.J., 2001. Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in witloof chicory roots. cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. Plant Physiol. 126, 1186–1195.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Boogaerts, D., Le Roy, K., Arckens, L., Van Laere, A., 2006. Cloning and functional analysis of a high DP fructan:fructan 1-fructosyl transferase from *Echinops ritro* (Asteraceae): comparison of the native and recombinant enzymes. J. Exp. Bot. 57, 775–789.
- Van den Ende, W., 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. Front. Plant Sci. 4, 247.
- Van den Ende, W., Clerens, S., Vergauwen, R., Van Riet, L., Van Laere, A., Yoshida, M., Kawakami, A., 2013. Fructan 1-exohydrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. Plant Physiol. 131, 621–631.
- Van der Valk, P., Scholten, O.E., Verstappen, F., Jansen, R.C., Dons, J.J.M., 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived

- callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 30, 181–191.
- Verhaest, M., Lammens, W., Le Roy, K., De Ranter, C.J., Van Laere, A., Rabijns, A., Van den Ende, W., 2007. Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytol.* 174, 90–100.
- Vijn, I., Van Dijken, A., Sprenger, N., van Dun, K., Weisbeek, P., Wiemken, A., Smeekens, S., 1997. Fructan of the inulin neoseris is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus* L.) harbouring onion (*Allium cepa* L.) fructan:fructan 6G-fructosyltransferase. *Plant J.* 11, 387–398.
- Vijn, I., van Dijken, A., Lüscher, M., Bos, A., Smeets, E., Weisbeek, P., Wiemken, A., Smeekens, S., 1998. Cloning of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined fructan molecules from sucrose. *Plant Physiol.* 117, 1507–1513.
- Vijn, I., Smeekens, S., 1999. Fructan: more than a reserve carbohydrate?. *Plant Physiol.* 120, 351–360.
- Wei, H., Bausewein, A., Greiner, S., Dauchot, N., Harms, K., Rausch, T., 2017. CiMYB17, a stress-induced chicory R2R3-MYB transcription factor, activates promoters of genes involved in fructan synthesis and degradation. *New Phytol.* 215, 281–298.
- Xu, H., Liang, M., Xu, L., Li, H., Zhang, X., Kang, J., Zhao, Q., Zhao, H., 2015. Cloning and functional characterization of two abiotic stress-responsive Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) fructan 1-exohydrolases (1-FEHs). *Plant Mol. Biol.* 87, 81–98.
- Yaguchi, S., McCallum, J., Shaw, M., Pither-Joyce, M., Onodera, S., Shiomi, N., Yamauchi, N., Shigyo, M., 2008. Biochemical and genetic analysis of carbohydrate accumulation in *Allium cepa* L. *Plant Cell Physiol.* 49, 730–739.
- Yoshimura, Y., Enomoto, H., Moriyama, T., Kawamura, Y., Setou, M., Zaima, N., 2012. Visualization of anthocyanin species in rabbiteye blueberry *Vaccinium ashei* by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1885–1895.
- Zaima, N., Yoshimura, Y., Kawamura, Y., Moriyama, T., 2014. Distribution of

- lysophosphatidylcholine in eddospem of *Oryza sativa* rice. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28, 1515–1520
- Zhang, C., Zhang, H., Zhan, Z., Liu, B., Chen, Z., Liang, Y., 2016. Transcriptome analysis of sucrose metabolism during bulb swelling and development in onion (*Allium cepa* L.). *Front. Plant Sci.* 7, 1425.
- Zhang, H., Cha, S., Yeung, E.S., 2007. Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization MS and MSn of small molecules. 2. Direct profiling and MS imaging of small metabolites from fruits, *Anal. Chem.* 79, 6575–6584.
- 青葉 高, 1955. 玉葱の肥大及び休眠に関する研究(第 3 報). 貯蔵中における萌芽過程について. *園学雑.* 24, 199-203.
- 在原章公, 熊谷利恵子, 入倉幸雄. 1991. バレイショ栽培品種のプロトプラストからの植物体再分化に及ぼす生長調整物質の影響. *育種・作物学会北海道談話会会報.* 32, 52-53.
- 藤井 健雄監修. 1978. 蔬菜の新品種. p. 144. 誠文堂新光社. 東京.
- 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会. 2012. 北海道野菜地図. p. 49-52. 北海道農業協同組合中央会・ホクレン農業協同組合連合会. 北海道.
- 加藤 徹. 1999. タマネギ = 植物としての特性. p. 基 3–10. 農業技術大系野菜編 8- ②. タマネギ・アスパラガス. 農文協. 東京.
- 久後裕菜, 山本彩実, 森山達哉, 財満信宏., 2016. イメージング質量分析の食品科学への応用. *日本質量分析学会誌.* 64, 11-15.
- 室 崇人, 大塩哲視, 中山敏文. 2004. タマネギの品種の特性と作型利用. p. 基 95–98, p. 基 100 の 4–16. 農業技術大系野菜編 8- ②. タマネギ・アスパラガス. 農文協. 東京.
- 大西忠男, 田中静幸. 2012. タマネギの作業便利帳. p. 48-63, 118. 農文協. 東京.
- 奥 聡史, 2016. タマネギ葉組織および鱗茎におけるフルクタン含量と生合成能の品種間差. 北海道大学大学院農学院 修士論文.

- 斎藤 新, 松塚祐樹, 高田 晃, 幸田泰則. 2006. タマネギの鱗茎形成を阻害する内生因子. 天然有機化合物討論会講演集. 475-480.
- 高儀雅俊, 豊井一徳, 一井眞比古. 1996. タマネギにおける根端組織由来カルスからの植物体再分化. 植物組織培養. 13, 181-183.
- 高橋 尚. 1988. ハイテクによる野菜の採種(そ菜種子生産研究会編). P393-396. 誠文堂新光社. 東京.
- 上西愛子, 野村 研, 大矢武志, 北宜 裕. 2001. 赤タマネギ‘早生湘南レッド’における初生根端カルスからの再生体誘導. 神奈川県農業総合研究所研究報告. 142, 57-61.
- 八鍬利朗. 1975. 北海道のタマネギ. p. 189-216, 382-388. 農業技術普及協会. 東京.
- 山崎 篤. 2016. 春まき夏どり栽培. p. 基 184 の 18-21. 農業技術大系野菜編 8- ②. タマネギ・アスパラガス. 農文協. 東京.
- 吉田みどり, 上野敬司, 川上 颯, 塩見徳夫. 2003. 植物フルクタン研究とその代謝遺伝子利用. 化学と生物. 41: 787-795.
- ホクレン農業協同組合連合会(発行年不明). 「ホクレン野菜種苗カタログ たまねぎ」.
<http://www.seeds.hokuren.or.jp/gaonline/image/pdf/02.pdf>
- 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター. 2016, 2017. 羊ヶ丘の気象観測データ. <http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/harc/kisyo/index.html>
- 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター. 2016. 東北・北陸地域におけるタマネギの春まき栽培技術 技術解説編.
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/spring-sowing_onions.pdf
- 高橋 勝利. 2013. 質量顕微鏡の植物組織観察への適用 新学術領域研究「植物の環境感覚: 刺激受容から細胞応答まで」. p. 10-14. 文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究. http://esplant.net/newsletter/contents/2013_3/News%20Letter5_all.pdf

謝 辞

本研究の遂行および論文執筆に際し、多大なるご指導、ご助言およびご校閲の労を賜りました北海道大学大学院農学研究院講師 志村 華子博士ならびに同研究院准教授 鈴木 卓博士に対し深甚なる感謝の意を表します。また、本論文作成にあたりご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院教授 近藤 則夫博士、同研究院教授 松浦 英幸博士、同研究院講師 実山 豊博士に対し、衷心より感謝申し上げます。

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）北海道農業研究センターの杉山 慶太博士、吉田みどり博士、村田奈芳氏、同機構東北農業研究センターの室 崇人氏、同機構九州沖縄農業研究センターの山崎 篤博士ならびに農研機構の技術職員の皆様からは、タマネギの栽培のご指導を賜りましたとともに、研究遂行に際しいつも暖かい励ましの言葉を頂きました。

酪農学園大学農食環境学群・食と健康学類准教授 上野 敬司博士ならびに同学類教授 小野寺 秀一博士からは、フルクタンの酵素活性の手法および機器分析に関するご指導を賜りました。弘前大学農学生命科学部国際園芸農学科教授 前田 智雄博士からは、著者の学部時代から現在までの研究生活に対しいつも励ましの言葉をいただくとともに、フルクタンをはじめとする機能性成分の分析手法に関するご指導を賜りました。北海道大学医学研究院特任助教 早坂 孝宏博士からは、植物材料を利用した MALDI-TOF Imaging MS の分析手法を賜りました。各位に対し、謹んで感謝の意を表します。

北海道大学大学院農学院園芸学研究室の先輩である阿部 圭馬博士、Yang-Hsin Hsu 博士、卒業生の武井 俊大氏、山岡 祥子氏、鶴田 遊氏、園芸学研究室の学生諸氏には、研究に関する貴重なアドバイスを頂戴したとともに、実験遂行に多くのご協力を頂きましたことを心より感謝いたします。

最後に、著者の大学での研究生活を長年支え励ましてくれた両親、妹および阿部 由季氏に感謝いたします。