

# 越冬作物はなぜ糖を蓄えるのか?

## —秋播コムギの雪腐病抵抗性とフルクタンとの関係—

中央農業総合研究センター 川上あきら  
北海道農業研究センター 吉田みどり

### はじめに

雪腐病は、積雪下で雪腐病菌がムギ類や牧草などの越冬作物に加害することによって引き起こされる病害の総称である。日本では、現在までに8種類の雪腐病が報告されている(表-1)。それらは菌種ごとにその発生生態が異なり、分布域も北海道にはほぼ限定されるものから、本州西部に至るまでその発生が報告されているものもある。近年、温暖化の影響から降雪量が減少し作物が雪に覆われる期間が減少したため、本病による被害も減少している。しかし北海道に代表される厳寒積雪地帯は、いまだに雪腐病の常発地帯となっている。北海道ではコムギや牧草類の雪腐病抵抗性育種が精力的に進められており、秋播コムギでは1990年代末に普及品種が「チホクコムギ」から「ホクシン」に替わり、格段に雪腐病抵抗性が向上した。しかし、根雪前の農薬散布はいまだに必須であり、さらなる抵抗性の付与が課題となっている。

### I ハードニングと雪腐病抵抗性

越冬作物は、ハードニング(低温順化)により越冬中の代謝や融雪後の再成長に必要な養分を蓄積するとともに、雪腐病抵抗性を獲得する(NAKAJIMA and ABE, 1994)。ハードニングとは、秋から根雪前にかけて徐々に変化する環境(主に気温の低下)を認識して、その後訪れる厳しい環境に耐えうる生理的・形態的变化を起こす機構で、越冬作物に必要不可欠なシステムである。札幌では、最低気温が10℃以下となる10月中旬頃から最高気温が氷点下前後となる根雪直前までハードニングが誘導される(MORIYAMA et al., 1995)。雪腐病抵抗性は、このハードニング期間およびハードニングが誘導される前の初期生育期間の長さに比例して増加する。そのため、雪腐病による被害軽減には適期播種が推奨されている(NAKAJIMA and ABE, 1996)。また、室内実験の結果から、ハードニング処理温度が低いほど雪腐病抵抗性の増加が顕著である。

The Role of Fructans on Snow Mold Resistance in Winter Wheat.  
By Akira KAWAKAMI and Midori YOSHIDA

(キーワード: 越冬作物、秋播コムギ、フルクタン、雪腐病抵抗性)

ることがわかっている。日長は雪腐病抵抗性の増加に大きく影響を及ぼさないものの、暗黒条件ではハードニングが誘導されないことから、一定以上の光が雪腐病抵抗性の発現には必要である。コムギ品種・系統間には上記の処理温度や期間に対する雪腐病抵抗性の増加に差があり、それが雪腐病抵抗性品種間差となって現れる。

### II ハードニングとフルクタン

ハードニング中に見られる植物の生理学的変化については、多くの研究が行われている(IMAI, 2004)。具体的には、膜成分の組成変化や糖をはじめとする適合溶質の蓄積、強親水性タンパクや不凍タンパクの増加などがあげられる。そのなかで最もダイナミックな変化を示す因子の一つが可溶性糖類である。秋播コムギをはじめとする越冬性イネ科植物がハードニング中に蓄積する可溶性糖類には、主にグルコース、フルクトース、スクロース、フルクタンが含まれる。特にフルクタンは、根雪直前には生重量の10%を超える蓄積が見られ、そのほとんどが液胞中に蓄積すると考えられている(YOSHIDA et al., 1998)。

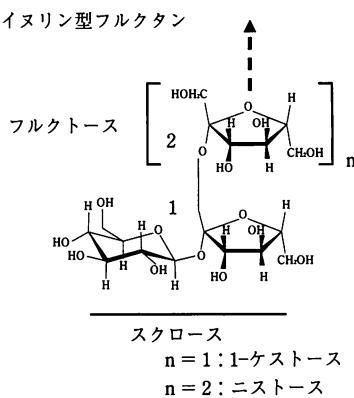
フルクタンは、主にスクロースにフルクトースが重合した三糖以上のオリゴ糖および多糖の総称で、微生物や植物に広く含まれている(吉田ら, 2003)。植物では、被子植物の15%もの種で何らかのステージで蓄積が見られることがわかっている。フルクタンの構造は大きく分けて、 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合でフルクトースが重合するイヌリン型フルクタンと、主として $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合で重合するレバーン型フルクタンに分かれる(図-1)。タマネギやアスパラガスなどのユリ科植物やレタスやキクイモなど

表-1 日本国内で発生が報告されている雪腐病

褐色雪腐病	<i>Pythium iwayamai</i> , <i>P. paddicum</i> et al.
紅色雪腐病	<i>Microdochium nivale</i>
雪腐大粒菌核病	<i>Sclerotinia borealis</i>
マメ菌核病	<i>Sclerotinia trifoliorum</i>
株腐病	<i>Ceratobasidium gramineum</i>
雪腐褐色小粒菌核病	<i>Typhula incarnata</i>
雪腐黒色小粒菌核病	<i>T. ishikariensis</i>
スッポヌケ症	未同定

キク科植物にはイヌリン型フルクトンが蓄積し、ムギ類やオーチャードグラスなどのイネ科植物にはレバーン型フルクトンが蓄積する。植物に含まれるレバーン型フルクトンには $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合以外に、 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合のフルクトースを側鎖として一部含むものがある。コムギでは、両結合様式のフルクトースが混在するフルクトンが蓄積し、そのような構造をとるフルクトンをグラミナンと呼んでいる。また、生育ステージにより蓄積するフルクトンの構造に変化が見られる。例えば、秋播コムギではハードニング中の茎葉部と開花後10日前後の茎部から抽出したフルクトンを比較すると、前者では $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合するフルクトースの割合が高く、より複雑な構造をもつフルクトンが蓄積していた。また、フルクトンの重合度(DP)は植物種により多様で、10程度から200を超える植物種も存在する。

イヌリン型フルクトン



レバーン型フルクトン

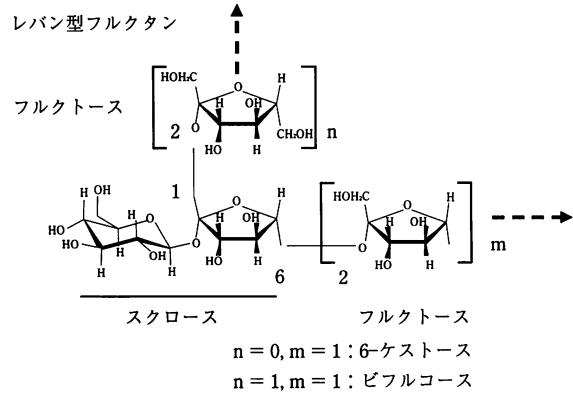


図-1 植物フルクトンの種類と構造

フルクトースの結合様式は図の縦方向に $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合、横方向に $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合を示す。

### III 雪腐病抵抗性とフルクトン

雪腐病抵抗性の異なる秋播コムギ品種間で、茎葉部およびクラウン部(茎基部)のフルクトン蓄積量を比較すると、両組織とも雪腐病抵抗性が強いコムギほど蓄積量が高い傾向がある(YOSHIDA et al., 1998)。また、遺伝分析の結果からも、秋播コムギではハードニング中に蓄積する非構造性炭水化物量と雪腐病抵抗性との間に正の相関があることが明らかとなっている(MAHOMMAD et al., 1997)。さらに、ハードニング中に蓄積する非構造性炭水化物の多くをフルクトンが占めていることから、雪腐病抵抗性とフルクトン蓄積量の間には密接な関係があると考えられた。しかし、フルクトンには抗菌作用はない。また、雪腐病菌にはフルクトンを栄養源として利用する能力の低い菌種も含まれているが、植物組織中にはスクロースやグルコースなどの容易に利用可能な糖類が多く含まれており、感染した雪腐病菌に対する植物組織中の栄養源不足による菌糸伸長抑制効果も期待できない。そのため、フルクトンの雪腐病抵抗性発現に対する役割は不明であった。

### IV 積雪下での雪腐病抵抗性とフルクトン蓄積量の変化

大地が雪に覆われると作物は暗黒条件におかれ、ハードニングは誘導されなくなる。そして、雪解けまでの長い期間(北海道では2~5か月間)、越冬作物はハードニング中に蓄積した養分を消費して生存することになる。積雪下は0°C前後で多湿の安定した環境となるとともに雪腐病菌が占有可能な条件となり、作物が本菌に加害されやすくなる。さらに、ハードニングにより獲得された雪腐病抵抗性は積雪下での埋雪期間の長さに伴って直線的に低下する(NAKAJIMA and ABE, 1994)。積雪下でのムギ類の糖代謝量の変化については湯川・渡辺(1995)によって詳細な解析が行われているが、雪腐病菌感染による影響を検討した例はほとんどない。そこで、根雪前まで野外で育成したコムギを用いて、積雪下での雪腐病菌の感染に伴う糖代謝量の変化およびPathogenesis-Relatedタンパクの一一種であるキチナーゼ遺伝子の発現量の変動を経時的に解析した(川上, 未発表)。

雪腐病菌(雪腐黒色小粒菌核病菌)を接種しない場合、コムギ組織中に含まれるフルクトンが徐々に分解される一方、グルコース、フルクトースやスクロース蓄積量には大きな変動が見られなかった。このことから、植物は呼吸その他で消費する代謝エネルギーを、フルクトンを分解することで補っていると考えられた。

雪腐病菌を接種した場合、コムギ組織中のフルクタン蓄積量は無接種の場合に比べ急激に減少した。特に雪腐病抵抗性の弱いコムギの茎葉部ではその傾向が顕著であり、接種後20日目にはフルクタンをはじめとする糖類がほとんど消費されていた。一方、キチナーゼ遺伝子の発現量は接種により増加した。そして、接種後20日目では雪腐病抵抗性の強いコムギではその発現が維持されたが、抵抗性の弱いコムギでは検出限界以下にまでその発現量が低下した。

光合成が不可能な積雪下では、根雪前までに蓄えられた糖類が越冬作物の主な代謝エネルギー源となっている。そして、フルクタンをはじめとする糖類の極端な減少は代謝エネルギー生産や生理活性の低下につながる。そのため、雪腐病抵抗性の弱いコムギでの接種20日目のキチナーゼ遺伝子発現量の低下には、組織中糖類の過剰な消耗の影響があったと考えられた。また、埋雪期間の長さに伴う雪腐病抵抗性の低下に関しても、フルクタン蓄積量の変化と関連付けることができる。つまり、積雪下では接種の有無にかかわらずフルクタンが徐々に分解されて蓄積量が低下することから、長く積雪下におかれたコムギほどフルクタン蓄積量が減少しており、その後の雪腐病菌感染による急激な蓄積量の低下による影響を大きく受けやすいと考えられた。

以上から、フルクタンは代謝エネルギー生産の資源として利用され、積雪下そして雪腐病菌感染後の生理活性や抵抗性反応の維持に重要な役割を果し、ハードニング過程でのフルクタン蓄積量がより多く確保される越冬作物ほど雪腐病抵抗性が強くなると考えられた。

そこで、秋播コムギのハードニング過程でのフルクタン蓄積、そして積雪下での雪腐病菌感染によるフルクタン分解機構の解析を行った。

## V ハードニング過程でのフルクタン蓄積機構

フルクタン合成にかかわる生化学的解析は、古くから精力的に進められてきた。そして、多くの植物からフルクタン合成酵素が分離精製され、各構造のフルクタンの合成過程にかかわる酵素が明らかとされてきた（吉田ら、2003）。ムギ類におけるフルクタン合成には、スクロース2分子を基質としてイヌリンタイプの三糖のフルクタンである1-ケストースを合成するスクロース：スクロース1-フルクトシルトランスフェラーゼ(1-SST)と、スクロースとフルクタンを基質としてスクロース由来のフルクトースを主に $\beta(2 \rightarrow 6)$ 結合でフルクタンに付加する活性をもつスクロース：フルクタン6-フルク

トシルトランスフェラーゼ(6-SFT)が重要であると考えられていた(DUCHATEAU et al., 1995)。1995年にはフルクタン合成酵素遺伝子が初めて単離され(SPRENGER et al., 1995)，それ以降フルクタン合成にかかわる分子生物学的解析が急速に進められてきた。しかし、コムギのフルクタン合成にかかわる遺伝子に関する報告はなされていなかった。そこで、ハードニング処理した秋播コムギから1-SSTと6-SFTをコードする遺伝子を単離し、野外で育成した雪腐病抵抗性の異なるコムギ5品種を用いた発現解析を行った(KAWAKAMI and YOSHIDA, 2002)。そして、茎葉部では雪腐病抵抗性が強い(フルクタン蓄積量が多い)コムギほどそれらの遺伝子の発現量が多く、フルクタン蓄積量とフルクタン合成酵素遺伝子発現量とがパラレルな関係となる結果が得られた。一方、クラウン部ではフルクタン蓄積量の多いコムギで発現量が多いものの、品種間のフルクタン蓄積量の差異を説明できるほどの発現量の差は認められなかつた。このことから、茎葉部とクラウン部ではフルクタン蓄積を制御するシステムに違いがあると考えられた。

次に、単離した2種類の遺伝子によりコードされるフルクタン合成酵素1-SSTと6-SFTによって、ハードニング中にコムギ組織に蓄積されるフルクタンが合成可能かどうかを検討した(KAWAKAMI and YOSHIDA, 2005)。単離遺伝子をもとに作成した2種類の組換えタンパクを基質となるスクロースと反応させ、その反応産物の解析を行った。その結果、得られた反応産物に含まれるフルクタンは、ハードニング中に秋播コムギが蓄積するフルクタンに比べ、 $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合フルクトースの割合が非常に低いことがわかった。つまり、この二つのフルクタン合成酵素1-SSTと6-SFTだけでは、ハードニング中に秋播コムギが蓄積するフルクタンと同じ構造をもつフルクタン分子種を合成することができないことが明らかとなった。

そのため、ハードニング処理した秋播コムギから新たなフルクタン合成酵素遺伝子をスクリーニングしたところ、フルクタン2分子を基質として分子間でフルクトースを $\beta(2 \rightarrow 1)$ 結合で転移させる活性をもつフルクタン：フルクタン1-フルクトシルトランスフェラーゼ(1-FFT)をコードする遺伝子が単離された(KAWAKAMI and YOSHIDA, 2005)。そして、新たに単離した遺伝子由来の組換えタンパクを調整し、上記2種類の組換えタンパクとともにスクロースを基質として反応させたところ、ハードニング中にコムギ組織に蓄積されるフルクタンと類似した構造をもつフルクタン分子種が合成されることがわかった。さらに、野外で12月までハードニングさせ

た秋播コムギの茎葉部およびクラウン部で、3種類のフルクトン合成酵素遺伝子がすべて発現していることも確認された（図-2）。

以上から、秋播コムギがハードニング過程でフルクタノースを合成する仕組みを明らかにすことができた。すなはち、光合成により合成されたスクロースを基質として、1-SST により最小のフルクタノース分子である三糖の 1-ケストースが合成される。そして、合成されたフルクタノースに対して、6-SFT が  $\beta(2 \rightarrow 6)$  結合のフルクトースを、1-FFT が  $\beta(2 \rightarrow 1)$  結合のフルクトースをフルクタノースに転移することによって、2つの結合様式のフルクトースを含むフルクタノースであるグラミナンが合成されることがわかった（図-3）。

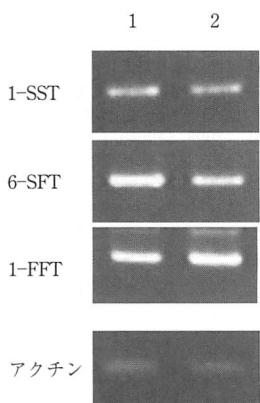


図-2 12月まで野外でハードニングさせた秋播コムギ茎葉部・クラウン部のフルクタン合成酵素遺伝子の発現

1: 茎葉部, 2: クラウン部, アクチン遺伝子は内部標準. フルクタン合成酵素遺伝子の正式名は本文参照.

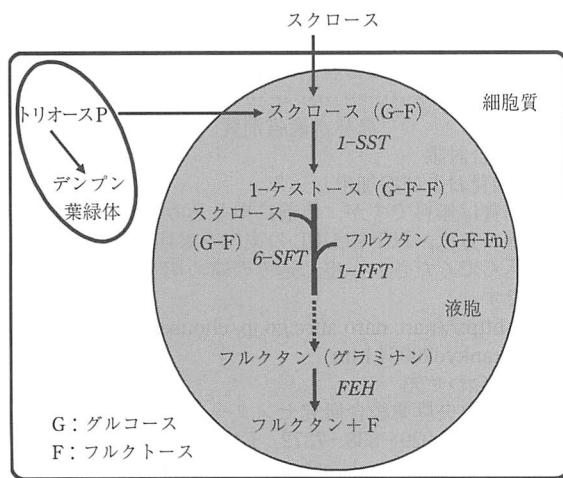


図-3 コムギの細胞内でのフルクタン合成・分解経路  
フルクタン合成・分解酵素の正式名は本文参照.

## VI 積雪下でのフルクタン分解

ハードニング中に蓄積したフルクタンは、積雪下で徐々に分解されるとともに、雪腐病菌の感染によって急激に分解されることが明らかとなった。フルクタンはフルクタン分解酵素によって分解される。この酵素は細菌、糸状菌から植物まで幅広い生物に存在する。しかし、植物がもつフルクタン分解酵素は、フルクタン末端からフルクトースを遊離するエキソ型分解酵素 (fructan exohydrolase, FEH) のみで、エンド型分解酵素は報告されていない (SIMPSON and BONNETT, 1993)。また、フルクタンを構成する  $\beta(2 \rightarrow 1)$  結合フルクトースを遊離させる活性が高い酵素 (1-FEH) と、 $\beta(2 \rightarrow 6)$  結合フルクトースを遊離させる活性が高い酵素 (6-FEH) が存在する。

多くの植物から FEH が精製され、その生化学的特性の解析が進められている。しかし、その遺伝子構造が明らかとなったのは、チコリーから単離された 1-FEH (VAN den ENDE et al., 2001) に関するものだけであった。また、コムギではハードニング過程および積雪下での FEH 活性の変化について報告されているが（湯川・渡辺, 1995），その分子生物学的解析は行われていなかった。雪腐病抵抗性を解析するうえで、フルクタン代謝機構を明らかにすることは重要と考えられた。そこで、雪腐病菌感染によるフルクタン分解に関与する FEH 遺伝子の単離解析を行った。

野外でハードニング処理したコムギおよび積雪下で雪腐病菌を接種した秋播コムギから、FEH 候補遺伝子 7 種類を単離した。それぞれの組換エタンパクの基質特異性を調べたところ、単離遺伝子は 1-FEH (VAN den ENDE et al., 2003), 6-FEH (川上, 未発表), 6 & 1-FEH (KAWAKAMI et al., 2005), 2 種類の細胞壁型インペルターゼ (川上, 未発表), そして 2 種類の 6-ケストース分解酵素 (6-KEH) (VAN den ENDE et al., 2005) をそれぞれコードすることが明らかとなった。このうち、FEH および 6-KEH 遺伝子について、野外でハードニングさせた秋播コムギを用いて積雪下での接種および無接種条件における発現解析を行った。その結果、6-FEH 遺伝子のみが茎葉部で雪腐病菌感染特異的に発現量が増加することがわかった。そして、6 & 1-FEH および 6-KEH 遺伝子は茎葉部に比べクラウン部での強い発現が見られる一方、菌感染特異的な発現量の増加は認められなかった。また、1-FEH 遺伝子は積雪下では常に発現が低いままであった (川上, 未発表)。

以上から、コムギは積雪下で複数のFEHアイソザイムを発現させフルクタンを代謝していることがわかつ

た。また、コムギは雪腐病菌の感染を認識し、特定のFEHの発現量を増加させてフルクタン分解を行っていることが明らかとなった。さらに、フルクタン分解について茎葉部とクラウン部では異なったFEHが関与していることも示唆された。

### おわりに

厳寒積雪地帯では、雪腐病抵抗性は耐凍性とともに越冬作物にとって必要不可欠な形質である。特に、北海道のように厳しい氷点下気温にさらされる前に雪で覆われる地域では、作物は強い雪腐病抵抗性をもつことが要求される。雪腐病抵抗性は、量的形質で複数の遺伝子が関与していると考えられている。そのため、雪腐病抵抗性を明らかにするうえでは、さらなる関与因子探索のための研究が不可欠となる。近年、雪腐病抵抗性にかかる遺伝子座の解析が精力的に進められており、育種への応用も期待されている（飼田ら、2005）。さらに、コムギの簡易な形質転換方法も報告され、フルクタン合成・代謝酵素遺伝子をはじめとする単離遺伝子のコムギを用い

た評価も可能となりつつある。今後は、作物の材料育成から分子レベルの解析まで複数の分野の連携が雪腐病抵抗性機構の解明、そして高度雪腐病抵抗性品種の開発に必要となるだろう。

### 引用文献

- DUCHATEAU, N. et al. (1995) : Plant Physiol. 107 : 1249 ~ 1255.
- 今井亮三 (2004) : 植物の生長調節 39 : 174 ~ 188.
- KAWAKAMI, A. and M. YOSHIDA (2002) : Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 : 2297 ~ 2305.
- \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ (2005) : Planta 223 : 90 ~ 104.
- \_\_\_\_\_ et al. (2005) : Genome 358 : 93 ~ 101.
- MAHOMMAD, F. et al. (1997) : Crop Sci. 37 : 108 ~ 112.
- MORIYAMA, M. et al. (1995) : Grassl. Sci. 41 : 21 ~ 25.
- NAKAJIMA, T. and J. ABE (1994) : Can. J. Bot. 72 : 1211 ~ 1215.
- \_\_\_\_\_ . \_\_\_\_\_ (1995) : ibid. 74 : 1783 ~ 1788.
- SIMPSON, R. J. and G. D. BONNETT (1993) : New Phytol. 123 : 453 ~ 469.
- SPRENGER, N. et al. (1995) : Pro. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 11652 ~ 11656.
- 飼田淳史ら (2005) : 育種学研究 7 : 432.
- VAN den ENDE, W. et al. (2001) : Plant Physiol. 126 : 1186 ~ 1195.
- \_\_\_\_\_ et al. (2003) : ibid. 131 : 621 ~ 631.
- \_\_\_\_\_ et al. (2005) : New Phytol. 166 : 917 ~ 932.
- YOSHIDA, M. et al. (1998) : Physiol. Plant. 103 : 8 ~ 16.
- 吉田みどりら (2003) : 化学と生物 41 : 787 ~ 795.
- 湯川智行・渡辺好昭 (1995) : 北陸農試報 37 : 1 ~ 66.

### 学界だより

#### ○第4回環境保全型農業技術研究会—生物機能を活用した病害虫防除新技術の開発からIPM普及へ—

- 日時：平成18年3月8日(水)10:00～16:30
- 場所：東京都北区西ヶ原1-23-3 滝野川会館大ホール【最寄り駅：西ヶ原（東京メトロ南北線）または上中里（JR京浜東北線）】
- 主催：(独)農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター
- 趣旨：新「食料・農業・農村基本計画」では、「農業生産の全体の在り方を環境保全に貢献する営みに転換していく」と環境を重視した政策の展開を述べている。中央農業総合研究センターは、環境保全型農業技術を広く関係者にアピールするために、これまで農薬に替わる病害虫防除技術や環境保全型農業を構築するための土壤肥料新技術について研究会を行ってきた。今回は、生物機能を活用した病害虫防除新技術の開発と総合的病害虫管理(IPM)について研究会を行い、IPMの理解と普及に向けた検討を行う。
- プログラム

- 微生物の機能を活用した病害虫管理技術
  - 昆虫病原性ウイルスの害虫防除への利用  
.....後藤千枝氏（中央農研・虫害防除部）
  - 微生物等の抵抗性誘導機能を利用したキャベツ根こぶ病の防除  
.....永坂 厚氏（東北農研・畠地利用部）

③バクテリオファージを利用した作物細菌病の新防除技術 .....畔上耕兒氏・井上康宏氏（中央農研・病害防除部）

- 天敵を利用した害虫管理技術
  - 土着昆虫病原性線虫による土壤害虫防除  
.....吉田睦浩氏（中央農研・虫害防除部）
  - 地域天敵資源を活用した新しい生物的防除技術の開発・普及と展望  
.....大野和朗氏（宮崎大学農学部）
- IPMの普及を目指した公立研究機関と行政の取り組み
  - 公立研究機関における弱毒ウイルス利用技術の実用化...小坂能尚氏（京都府農業資源研究センター）
  - 総合的病害虫管理(IPM)実践指針の策定  
.....中森 茂氏（農林水産省消費・安全局植物防疫課）

- 総合討議
- 参加費および参加申し込み  
参加費は無料ですが、事前に申し込みが必要です。参加希望の方は、以下のURLの案内を参照し、事務局に申し込んでください。申し込みの締め切りは2月28日(火)です。

URL <http://narc.naro.affrc.go.jp/chousei/kouryuka/kankyo20064.htm>

- 問い合わせ先  
事務局：中央農業総合研究センター企画調整部  
TEL029-838-7372, FAX : 029-838-8574  
E-mail [kankyo@naro.affrc.go.jp](mailto:kankyo@naro.affrc.go.jp)