

博士論文

クルクリゴの栽培を通じた味覚修飾タンパク質
ネオクリンの生産とネオクリン遺伝子解析

大久保 智史

目次

第1章 序論.....	1
第2章 クルクリゴの花の構造と果実生産の関係の解明.....	14
序.....	15
材料および方法.....	16
結果.....	18
考察.....	27
第3章 クルクリゴの果実に含まれるネオクリンの分布と含量の解析.....	32
序.....	33
材料および方法.....	34
結果.....	36
考察.....	43
第4章 クルクリゴとオオキンバイザサの果実におけるネオクリンとネオクリン類似遺伝子の比較解析.....	46
序.....	47
材料および方法.....	49
結果.....	53
考察.....	81
第5章 総合討論.....	86
参考文献.....	96
論文の内容の要旨.....	106
謝辞.....	110

第 1 章

序論

クルクリゴについて

クルクリゴ *Curculigo latifolia* Dryand. ex W.T.Aiton は、インドから東南アジアに生息するキンバイザサ科(*Hypoxidaceae*)キンバイザサ属の多年草である(Kocyan et al., 2011; Steenis et al., 1993)。かつてはユリ科に分類されていたこともあるが、近年の遺伝情報に基づく APG 分類体系[最新情報は APG IV(The Angiosperm Phylogeny Group, 2016)]では、クルクリゴはキンバイザサ科に分類されている。

伝統的に、キンバイザサ属植物の花や根、茎、葉は薬用目的として活用されてきた(Asif, 2012; Li et al., 2019; Nie et al., 2013; Wang et al., 2010)。クルクリゴについても、マレーシアパハン州では塊茎の煎液が月経過多に用いられているとともに、マレー地方では解熱にも用いられている(Burkill, 1966)。近年の含有成分に関する調査では、抗ガン作用や抗糖尿病作用を持つ化合物を含有していることも確認されている(Babaei et al., 2012; Babaei et al., 2014; Ishak et al., 2013; Ismail et al., 2010; Ooi et al., 2016; Ooi, Adamu, et al., 2018; Ooi, Azmi, et al., 2018)。

クルクリゴ植物体の外見は、草丈、幅ともに 1.5 m ほどであり、短い茎から長さ 1 m 程度の披針形の葉を出しているという特徴を有する。一方、鉢植えのクルクリゴでは、高さ 70–80 cm、直径 70–80 cm が一般的である (図 1-1A)。1 個体のクルクリゴからは、およそ 10 枚の葉が生えており、長さとは幅はそれぞれ 60–70 cm、20 cm 程度、葉柄は 20–30 cm 程度である。基部の葉の間から長さ 10 cm 程度の短い花序を出し、直径 2cm ほどの黄色の花を多数つける (図 1-1B)。花序の低い位置の花は雌雄両性花であり、花序の高い位置の花は雄花である(Backer & Bakhuizen van den Brink, 1968)。授粉は昆虫によって行われる(Ismail et al., 2010)。種子繁殖が可能であるとともに、長さ 10 – 50 cm のストロンを出し、小さな株を作って増殖することもできる (図 1-1E)。2 倍体で $2n = 18$ ($x = 9$)である(Eksomtramage et al., 2013)。自生地では葉の繊維を漁網として用いるほか、果物を包むのにも用いられている(Burkill, 1966)。

クルクリゴは未だ栽培化されていないため、研究に用いる植物体として野生の個体群が保持されている。マレーシアでの ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)マーカーを用いた研究では、個体群ごとに高い独立性があることが示され(Babaei et al., 2012; Ranjbarfard et al., 2014)、繊維の量や質に関わる表現型の多様性に関する調査についてもインドネシアで実施されている(Raden et al., 2017)。

クルクリゴは、同属のキンバイザサ属に属するオオキンバイザサ *Curculigo capitulata* (Lour.) Kuntze と良く似た外見を示す (図 1-2)。オオキンバイザサと比較し、クルクリゴの方が草丈がやや小さく、葉が幅広い。またクルクリゴの花序柄は短く、ほとんど地面すれすれで開花するのに対して、オオキンバイザサの花序柄は 5 – 15 cm あり、地面よりも高い位置で開花する。また開花をよく観察したところ、クルクリゴは朝開花し昼に閉じる 1 日花なのに対して、オオキ

ンバイザサは朝に開花し翌日の夕方に閉じる 2 日花であった。オオキンバイザサは日本の植物園の温室でも普通に見られる植物で、「カークリゴ」の呼称で切り花材料としても知られている。これらのことから日本では、クルクリゴとオオキンバイザサはしばしば混同される (原島, 2017)。クルクリゴ、オオキンバイザサが属するキンバイザサ科の系統解析は、Kocyan らによって行われている [(Kocyan et al., 2011)、図 1-3]。葉緑体 DNA に基づく分類によって、両種は *Curculigo* clade と呼ばれる集団に属することが明らかとなっている。

クルクリゴの果実は、甘く食用としても利用される。さらに、果実を食べた後に酸味や水を飲むと甘く感じられる「味覚修飾作用」が備わっていることも古くから知られている。この味覚修飾作用を示す物質は糖タンパク質のネオクリンである。ネオクリンはそれ自身が甘味を感じさせるだけでなく、このタンパク質を口にした後に酸や水を味わうと強烈な甘味を誘導する (Yamashita et al., 1995)。現在のところ、ネオクリンは甘味活性と味覚修飾活性を併せ持つ唯一の甘味タンパク質として知られている (Kant, 2005)。果実中のネオクリンタンパク質含量は、授粉後 4 週間でピークに達するとされている (Nakajo et al., 1992)。

味覚修飾物質について

味覚修飾物質とは、食品成分そのものには化学的な変化を与えず、味覚器に働いて一時的に本来の味とは異なる味覚をもたらす物質である。現在までに表 1-1 に示す物質が味覚修飾物質として機能することが知られている (伊藤, 2008; Deepankumar et al., 2019)。ギムネマ酸、ジジフィン、ホタロシドは甘味を阻害する。ゲルマリンは甘味阻害活性を有するタンパク質であり、ヒトには効果が無く、齧歯類のみに作用する。ネオクリンと配糖体のストロジンとは水を甘味に変える作用を持つ (Hiura et al., 1996; Sugita et al., 1998)。またネオクリンと、ミラクルフルーツ [*Synsepalum dulcificum* (Schumacher et Thonn.) Daniell] の果実に含まれるミラクリンの両タンパク質は、酸味のあるものを甘味へと変換する性質を有し、このような作用を持つ物質はこれら以外には報告されていない。

ミラクルフルーツとミラクリンについて

ミラクルフルーツは、アフリカ西部の熱帯雨林に生息するアカテツ科 (Sapotaceae) の低木である (図 1-4A)。葉の脇に長さ 5 mm 程度の小さな白色の花をつけ、果実は長さ 3 cm、直径 2 cm 程度の赤色楕円形となる。果実は食べると甘味があり、中央に果実体積の半分ほどを占める大きな種子を 1 つ含む。ミラクリンは果肉に含まれるホモ二量体のタンパク質である (Theerasilp et al., 1989)。ミラクリン自身には甘味はなく、ミラクリンを口に含んだ後に酸を味わうことで強い甘味を呈する。ミラクリンの一次構造は Kunitz 型トリプシンインヒビターと 30% 程度の相同

性を有する。ミラクリンはヒト以外の生物では、高等なサルのみ感受性を示し、齧歯類は感受性を示さないことが知られている(Danilova & Hellekant, 2006; Hellekant et al., 1998)。

ミラクルフルーツは栽培が比較的容易であり、15 – 20 °Cの最低気温を確保しさえすれば栽培が可能であることが知られている。日本の気候条件でも栽培が可能であり、夏季には自然に開花結実する。夏になると珍奇植物の一つとして、生花店やホームセンターで結実株が販売されることがある。果実は凍結乾燥によって長期保存でき、ナムコ・ナンジャタウンのミラクルフルーツカフェでは、酸味のあるデザートや飲み物と一緒に提供された(株式会社ナムコ, 2005)。2023年現在では Amazon などのインターネット販売で凍結果実を購入することができる。

ミラクリンとネオクリンの比較を図 1-4B に示す。

クルクリゴに含まれる味覚修飾物質の同定の歴史

クルクリゴの果実が水を甘くする作用は古くから知られていた。1966 年に出版された事典 a Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula (Burkill, 1966)の *Curculigo latifolia* の項目には、以下のように紹介されている。

“Ridley (*Agric. Bull. Straits and F.M.S.* 1, 1902 p. 536) describes them thus: ‘they have a taste of sweetened cucumbers, and ... although they are by no means very sweet, and leave no distinct sweet taste in the mouth afterwards, yet for some considerable time any liquid that is drunk after eating one or two to possess a strong mawkish sweetness. The effect lasts for an hour or so.’”

味覚修飾作用の活性本体がタンパク質であることが明らかとなったのは 1990 年のことだった(Yamashita et al., 1990)。当初、クルクリゴから精製された活性を有するタンパク質は、ホモダイマーとして存在するクルクリン curculin とされていた。このタンパク質に対応する核酸塩基配列は 1992 年に明らかにされた(Abe et al., 1992)。このクルクリンの遺伝子配列を元に微生物を用いた異種発現系構築が試行されたものの、味覚修飾活性を有するリコンビナントタンパク質を得るには至らなかった。

後になって、Shirasuka らによってクルクリゴ果実から味覚修飾活性本体が再度精製され、精製タンパク質がヘテロダイマーから構成されていることが明らかとなった(Shirasuka et al., 2004; Suzuki et al., 2004)。クルクリンのモノマーとして同定されていたタンパク質はネオクリン塩基性サブユニット (neoculin basic subunit, NBS)と改名され、新たに発見された酸性サブユニットはネオクリン酸性サブユニット (neoculin acidic subunit, NAS)と名付けられた (図 1-5)。NBS は 114 アミノ酸残基からなり、NAS は 113 アミノ酸残基からなる糖鎖の付加したサ

ブユニットである。NBS と NAS はジスルフィド結合を介して結合している。NBS と NAS はアミノ酸配列で 77 % と高い相同性を示す (図 1-5) もの、それぞれのサブユニットの等電点は大きく異なる。NBS の等電点は 7.5 – 9.5 であるのに対し、NAS は 4.0 – 6.0 である。ネオクリンの各サブユニット一次構造はスノードロップレクチン (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) などのマンノース結合レクチンとの相同性が極めて高いが、3 か所のマンノース結合サイトを欠いているため、ネオクリンはレクチン活性を持たない (Barre et al., 1997; Shimizu-Ibuka et al., 2008)。またマンノース結合レクチンには抗菌活性を持つものがある (Ngai & Ng, 2007; Silva et al., 2019)。しかし、ネオクリンが同様であるかどうかについてはこれまでに検討されていない。

ネオクリンがヘテロダイマーであることが明らかとなったことから、味覚修飾活性を有するリコンビナントネオクリンタンパク質がすでに得られている (Kurimoto et al., 2007; Nakajima, Asakura, Maruyama, et al., 2006; Suzuki et al., 2004)。これにより、ネオクリンのアミノ酸の一部を入れ替えた変異体を用いた解析が可能となった。さらに、ネオクリンはヒトの甘味受容体である T1R2/T1R3 を介して受容されることも明らかとなっている (Nakajima, Asakura, Oike, et al., 2006)。さらにその受容部位として、T1R3 サブユニットの N 末端細胞外ドメインが重要であることが示唆されている (Koizumi et al., 2007)。

ネオクリンがなぜ味覚修飾活性を有するのかを構造の見地から解明するため、ネオクリンの中性 pH での立体構造が Shimizu-Ibuka et al. によって明らかにされた (Shimizu-Ibuka et al., 2006)。ヘテロダイマーからなるタンパク質の全体構造は図 1-6 のようである。NBS、NAS 両方のサブユニットにおいて 4 本の β -ストランドが組となって、3 つの β -シートを形成している。これら β -シートは互いに向き合い三角柱の形に配置されている。全ての β -シートは逆並行で、12 番目の β -ストランドはもう一方のサブユニットに由来する。中性 pH 条件以外での立体構造は解かれていないものの、NMR 法を用いてネオクリン分子の pH に依存した立体構造変化を捉える試みがなされている (Koizumi et al., 2015)。これにより NBS の Arg-48、Tyr-65、Val-72、Phe-94 がヒトの甘味受容体への結合と活性化に機能することが明らかとなっている。

また分子動力学法によるシミュレーションも行われている (Ohkubo et al., 2015)。このシミュレーションでは、ネオクリンは中性では四量体として会合しており、甘味受容体に結合できる部分 (His-11) が隠れているため甘味がないことが示された。一方で、酸性にすると、四量体が二量体に乖離した後、単量体となり甘味受容体に結合できる部分が露出されるため、甘味受容体とネオクリンが結合し甘味を呈すると推定された。

本研究の目的

味覚修飾タンパク質であるネオクリンに関しては、以上のように様々な方法でアプローチが行われてきており、ヒト味覚受容体との相互作用の実態についても推定されている。しかし植物自体は野生には存在するものの栽培化されていないため、原産地以外ではアクセスすることが困難であるという課題が残っていた。

日本においても、一部の植物園でわずかに栽培されているだけであったが、筆者は勤務先の日本新薬株式会社山科植物資料館でこの植物を扱うことができた。ミラクルフルーツは前述のように生花店で販売され、温室等で最低温度を守れば栽培可能で、開花結実する。しかし、クルクリゴは温室で栽培すれば開花にまでは至っていたものの、結実することは極めてまれであった。したがって、クルクリゴそのものを広く研究材料とするためには、クルクリゴの栽培法、果実生産について整理する必要があるという状況であった。そしてクルクリゴ植物を栽培し果実を得ることにより、ネオクリンを大量に生産できれば、食品への利用が容易になる。これまでに期待されてきた非グリセミック甘味料としての利用（荒井・清水, 2007）を超えて、普遍的な甘味料として利用されうる。特に味覚修飾作用を活かせる酸味のある食品とは相性が良く、酢を用いた食品（酢酸）、ヨーグルト（乳酸）、コーヒー【酸味を呈する成分としてクエン酸、リンゴ酸、酢酸が主であり、焙煎によってギ酸、酢酸、乳酸が増す（平ら, 2022)】では、実際に試食したところでは自然な甘さを得られた。

一方で、ネオクリンがレクチンに似た構造を示すタンパク質でありながら、レクチン活性を持たないネオクリンが植物体中で何故存在するのかという点にも興味を持たれた。新鮮果実を得ることにより、ネオクリンだけでなく、ネオクリンに変化する起源となったレクチンの手がかりが得られる可能性があることが想定された。ネオクリンと祖先であるレクチンを比較することで、これらタンパク質の機能や、植物体内での役割を明らかにすることが期待できる。

そこで本研究では、第1に確実に果実を実らせるための条件を明らかにすることをを行った（第2章）。続いて、果実からネオクリンを得るために最適な収穫時期を検討するため、果実中のネオクリン含量を経時的に調査した（第3章）。3番目には、クルクリゴおよび同属植物のオオキンバイザサ *Curculigo capitulata* を比較対象に、ネオクリンとネオクリン類似遺伝子が両種でどのくらい存在するのか解析を行った（第4章）。最後に、クルクリゴの開花、結実習性について、およびネオクリンとその類似タンパク質について改めて考察し、今後の展望を記述した（第5章）。

表 1-1 現在までに知られている味覚修飾物質（伊藤, 2008 より引用、改変）

物質	起源(和名/学名)	効果	活性本体
ミラクリン	ミラクルフルーツ <i>Synsepalum dulcificum</i>	酸味を甘味に変換	タンパク質
ネオクリン	クルクリゴ <i>Curculigo latifolia</i>	酸味を甘味に変換、 水を甘くする	タンパク質
ストロジン	<i>Staurogyne merguensis</i>	水を甘くする	配糖体
ギムネマ酸	ホウライアオカズラ <i>Gymnema sylvestre</i>	甘味阻害	配糖体
グルマリン	ホウライアオカズラ	甘味阻害	タンパク質
リボフラビン結合タンパク質	ニワトリ <i>Gallus gallus domesticus</i>	甘味阻害、 苦味阻害	タンパク質
ジジフィン	ナツメ <i>Ziziphus jujuba</i>	甘味阻害	配糖体
ホタロシド	ケンポナシ <i>Hovenia dulcis</i>	甘味阻害	配糖体

A



B



C



D



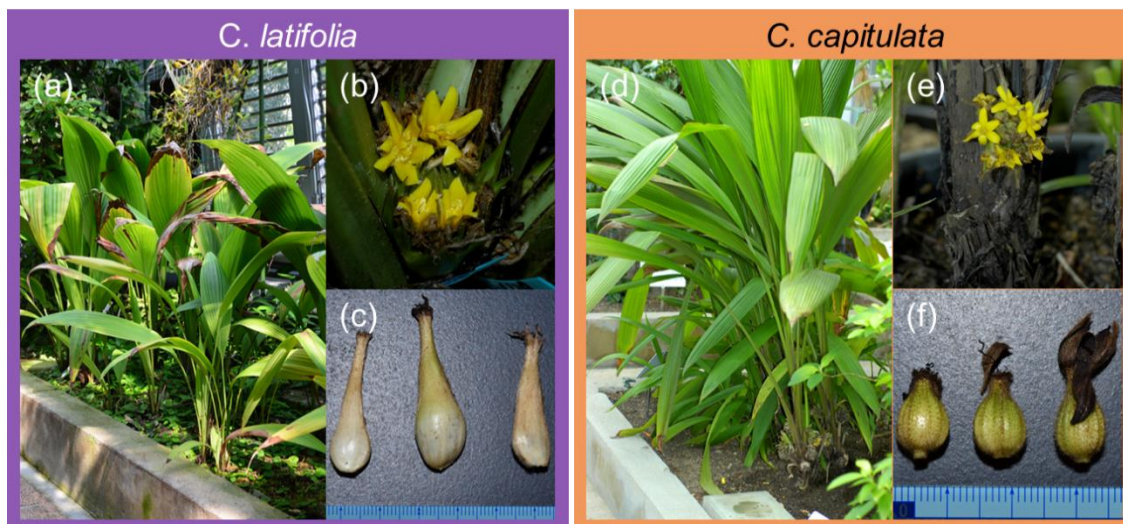
E



図 1-1 日本新薬株式会社山科植物資料館で栽培されるクルクリゴ *Curculigo latifolia*

- (A) ガラス温室内での栽培の様子。
- (B) 株元にある花序。白線の長さは 5cm である。
- (C) 鉢を抜いた状態における根とストロンの様子。
- (D) 根元部分の拡大写真。白色中括弧で示した部分が茎。
- (E) スترون(赤色中括弧)の先端に生じた小株。

A



B

種名	クルクリゴ	オオキンバイザサ
葉の長さ	30 – 100 cm	60 – 150 cm
葉の幅	5 – 10 cm	5 – 15 cm
花序の茎の長さ	無柄または 4 – 10 cm	5 – 30 cm
果実の形	嘴状に伸びる (beaked)	嘴状ではない (not beaked)
1つの花の開花期間	1日(午前中)	2日

図 1-2 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の比較

(A) 日本新薬株式会社山科植物資料館で栽培しているクルクリゴ(a、b、c)とオオキンバイザサ(d、e、f)。全体(a、d)、花序(b、e)、果実(c、f)。

(B) クルクリゴとオオキンバイザサの部位ごとの違い。Flora Malesiana (Steenis et al., 1993) を元に作成。

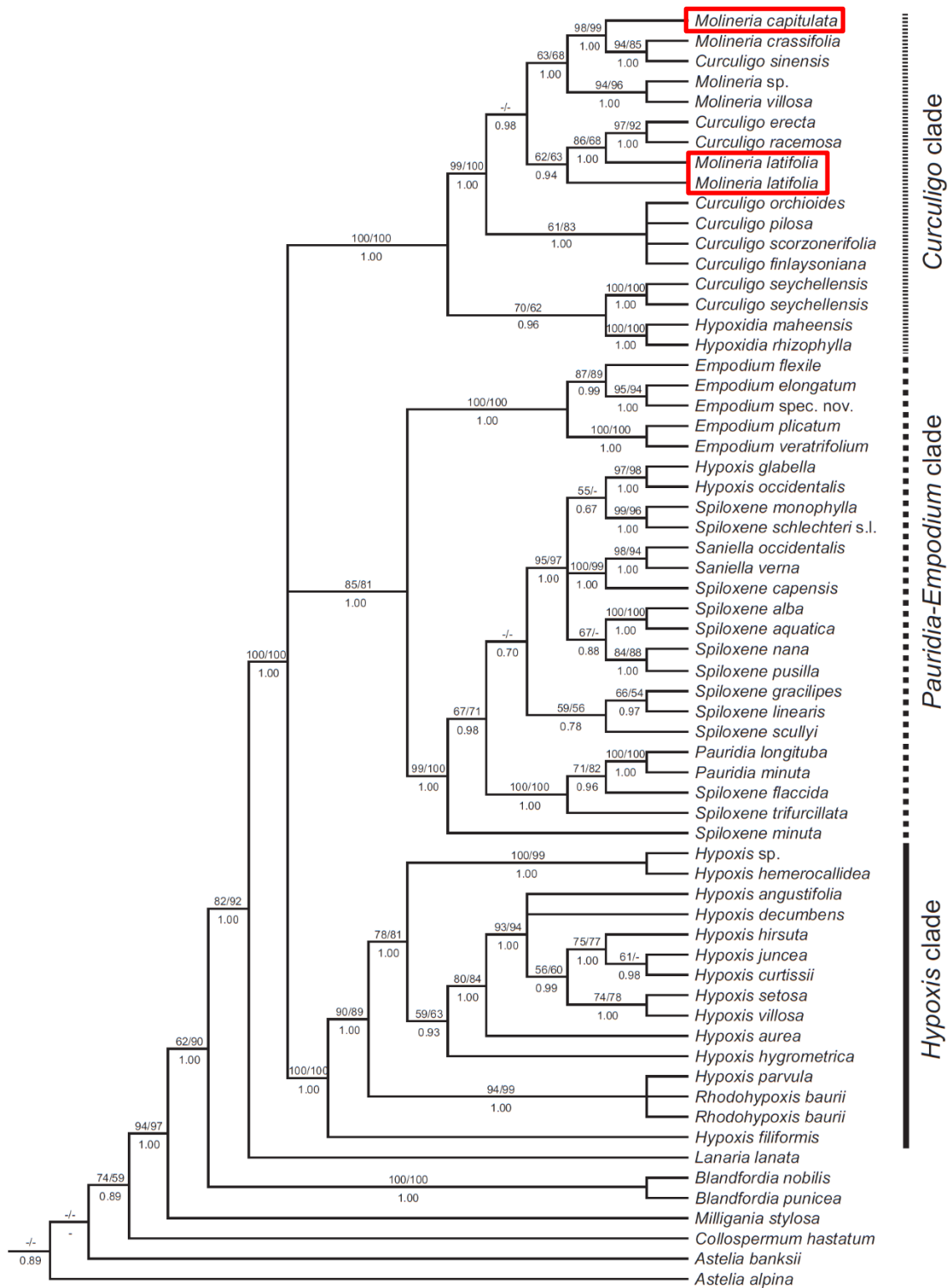


図 1-3 葉緑体 DNA データセットの解析で得られたキンバイザサ科の系統樹

クルクリゴは *Molineria latifolia*、オオキンバイザサは *Molineria capitulata* としてある。クルクリゴ、オオキンバイザサを赤枠で示した。

Kocyan et al., 2011 より引用、追記。

A



B

和名	ミラクルフルーツ	クルクリゴ
学名	<i>Synsepalum dulcificum</i>	<i>Curculigo latifolia</i>
科名	アカテツ科	キンバイザサ科
原産	西アフリカ	東南アジア
種類	木本	多年生草本
味覚修飾物質	ミラクリン	ネオクリン
分子量(kDa)	42 - 44	26
	ホモ二量体	ヘテロ二量体
アミノ酸残基	191	113(NAS)、114(NBS)
類縁物質	Kunitz 型 トリプシンインヒビター	マンノース結合レクチン
それ自身の甘味活性	甘味なし	甘味あり
酸味に対する味覚修飾活性	あり	あり
水に対する味覚修飾活性	なし	あり
味覚修飾活性持続時間	30 - 60 分	1 - 2 時間

図 1-4 ミラクルフルーツとクルクリゴの比較

(A) 日本新薬株式会社山科植物資料館で栽培されるミラクルフルーツ

(B) ミラクルフルーツおよびミラクリンとクルクリゴおよびネオクリンの比較。ミラクリンとネオクリンは味覚修飾物質という共通点はあるが、起源となる植物種やタンパク質の種類は大きく異なる。

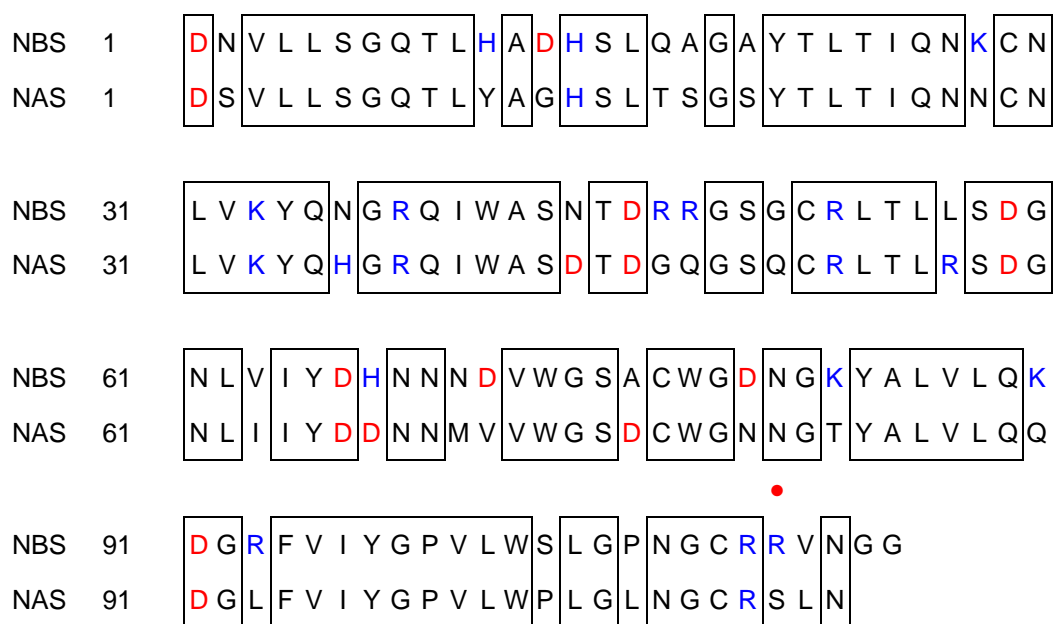


図 1-5 ネオクリンのアミノ酸配列

NBSとNASのアミノ酸配列のアラインメント。NAS、NASで共通するアミノ酸残基を枠で囲んだ。酸性アミノ酸残基、塩基性アミノ酸残基をそれぞれ赤、青で示す。赤い丸印はNASにおける糖鎖付加部位(N81)を示す。

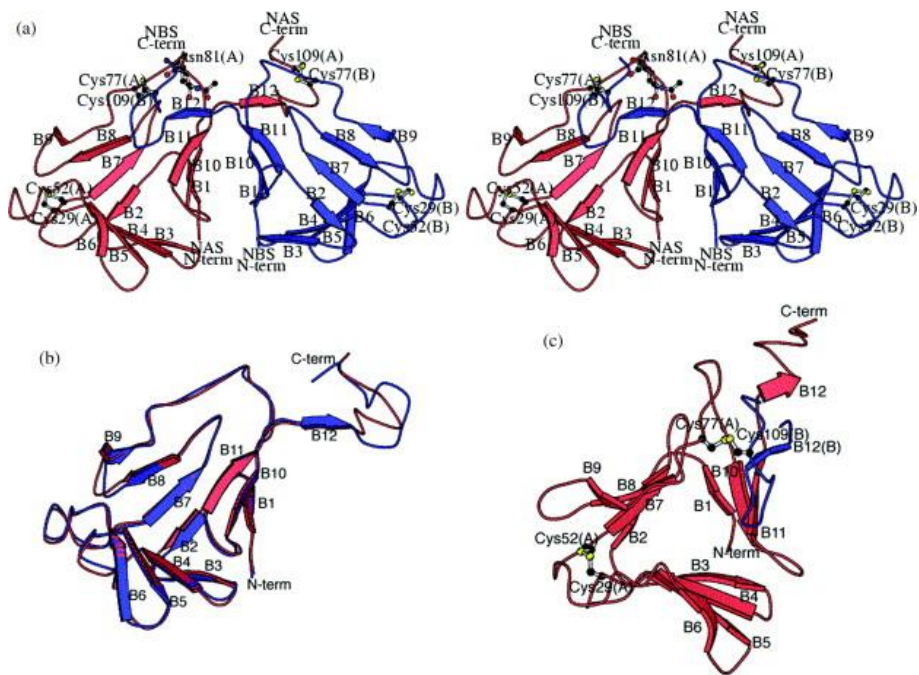


図 1-6 X線結晶構造解析により決定された中性条件下におけるネオクリンの立体構造
赤が NAS、青が NBS を示す。

- (a) ネオクリンの結晶構造。
- (b) NAS と NBS の重ね合わせ。
- (c) NAS の立体構造。

図は Shimizu-Ibuka et al., 2006 より引用。

第 2 章

クルクリゴの花の構造と果実生産の関係の解明

序

温室におけるクルクリゴ栽培において、十分な草丈（高さ 50 cm – 1 m）にまで育つことができるスペースを確保し、越冬可能な温度で栽培しさえすれば、開花までは容易に至ることができる。しかし、人手をかけずに放置しておく、ほとんど結実することはない。人工授粉についても試行してみるも、これまでの知見からでは結実率を高めることは困難であった。

Backer & Bakhuizen van den Brink によれば、クルクリゴ植物体において花序の低い位置の花は雌雄両性花である一方で、高い位置の花は雄花であるとされる(Backer & Bakhuizen van den Brink, 1968)。このため、筆や梵天（耳かきの端に付属しているような球状にした羽毛）のような道具を用い、やみくもにクルクリゴの花をなでて花粉を雌蕊に付けても、授粉の成功率が高まることは期待できないと想定される。そもそも、両性花はどのくらいの数が存在し、どのくらいの期間開花しているのか、見た目が両性花であれば結実するかなど、クルクリゴの花自体についても不明な点は多く残されていた。また、クルクリゴに自家和合性があるかどうかについても、報告された知見は存在しなかった。

一方で、味覚修飾活性を有する果実中タンパク質であるネオクリンを効率よく入手する方法として、微生物を宿主とした発現生産が考えられる。*Escherichia coli* (Kurimoto et al., 2007; Suzuki et al., 2004) や *Aspergillus oryzae* (Nakajima, Asakura, Maruyama, et al., 2006) を宿主として用いる方法なども、既に開発されている。しかしながらこの発現生産においても、十分量のリコンビナントネオクリンタンパク質を得るには技術的な困難が伴い、果実から天然タンパク質を取得するという古典的な方法も、十分に有効であることが推察される。

以上のような背景から本章では、栽培条件下のクルクリゴ植物体における果実生産を確実に行うために、花の構造観察と人工授粉方法の検討を行った。具体的には花序毎の開花数や、雄蕊と雌蕊の長さに関する測定を行った。また、同じ花での授粉（自家受粉）と、別々の株の雄蕊と雌蕊の授粉（他家受粉）を繰り返し行い、自家和合性の有無を確認することにした。

なお本章に記載の結果については、Okubo et al., (2010)にて報告した。

材料および方法

植物材料

クルクリゴは、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所薬用植物資源研究センター（つくば市）から、インドネシアで採集したものを分与いただいた。当初、1996年に3株を入手し、以後、温室で継続的に栽培した。3株が同じクローン由来かどうかは明らかではなく、また2001年までランダムに株分けを行ったことから、その後に増殖した個体の親が最初の3株の中のどれであるかも、現状は不明となっている。

クルクリゴ植物体は直径30 cm、高さ50 cm、容積10.7 Lのプラスチック鉢で栽培した。培養土は赤玉土、日向土、桐生砂、腐葉土、土太郎（スマリン農産）を2:1:2:1:2で混合した土を用いた。全ての娘植物は取り除いた。寒期（およそ10月から6月）には最低気温が20℃以上になるように、電気暖房機で温度を維持した。灌水は十分に行い、施肥は週に1回、1000倍希釈の液体肥料(N:P:K = 6:10:5)を1Lずつ与えた。

温室における1年間の開花数

2006年に、3株の開花数を1週間毎に数え、1植物ごとの平均開花数を計算した。電気暖房機は1月1日から6月27日までと9月29日から12月31日まで使用した。データロガーを用いることで、10分ごとの温室内温度を記録した。1週間毎に最低気温の平均、平均気温、最高気温の平均を記録した。

雌蕊と雄蕊の大きさ

9個体のクルクリゴを使用した。花は毎日8時 - 10時の間に採集した。2003年の5月 - 12月には7個体の9花序を、2004年4月から2005年1月には3個体から16花序を、それぞれ採集した。1個体は2つの期間で同じ個体を使用したことから、全体としては9個体から得られた25花序を解析に使用した。雌蕊と雄蕊は花から取り外して測定し、最も長い雄蕊の長さ、雌蕊の長さ、柱頭の幅を測定した。なお、雌蕊と雄蕊については、これらの湾曲を伸ばさずに計測した。

花の数

花の数は、1日に開花する花の最大数を決定するために記録した。2003年から2004年に、上記の9個体の25花序の花を数えた。各々の花序の中で、最初の花が咲いた日にちを第1日目として定義した。

不和合性

人工授粉実験のために、2003年の7月から10月に、12個体の両性花を他家受粉・自家受粉の実験に用いた。他家受粉実験は2003年10月から2004年12月にも継続して実施した。全体として15個体を、この実験の実験対象とした。

人工授粉の際には、開花当日にピンセットで雄蕊から葯を取り外し、柱頭にこすりつけた。花序ごとに自家受粉をする花と他家受粉をする花を、あらかじめ設定してから作業を行った。他家受粉の場合には異なる個体の両性花に由来する雄蕊を、自家受粉の場合には同じ花に由来する雄蕊を、人工授粉の作業に用いた。他家受粉に際して、どの株が花粉親となったかは記録しなかった。受粉が成功したかどうかについては、後日、果実が成熟した時点で受粉成功と判断した。

結果

まず、これまでの経験則から示されている、クルクリゴの栽培方法について述べる。クルクリゴは東南アジアが原産であり(Steenis et al., 1993)、日本では冬季に温室を必要とする。我々が山科植物資料館(京都市)で屋外での越冬を試みたところ1 - 2月に枯死したため、生存できる最低気温は5℃ないしは10℃くらいだと考えられる。山科植物資料館では温室の最低温度を20℃に設定しているため、20℃以上での栽培を継続している。

クルクリゴは森林の林床や林縁に生息する(Backer & Bakhuizen van den Brink, 1968)ことから、樹木の下に植えたり、50%程度の寒冷紗を設置したりして半日陰となるようにしている。直射日光でも直ちに枯れるわけではないが、葉が日焼けして部分的に枯れるので避けている。一方、棚下のような完全な日陰では徐々に衰弱し枯死する。

灌水は観葉植物を標準的に栽培する場合と同様に、土の表面が乾いたら十分に与えている。無施肥であっても成長するものの、施肥をした方が開花数は多くなる。液体肥料(例えば液体ハイポネックス)、固形肥料(例えばIB化成)のいずれでも良く、観葉植物に指定された施肥量に準じて施肥している。野菜ほど大量の肥料は必要ないが、観葉植物に指定された量より多くても問題なく良く育つ。

クルクリゴの培養土は特に選ばず、畑の土、市販の培養土で栽培可能である。鉢植えの植え替えは毎年行うよりも、小株の混み具合を勘案して数年に1回とした方が良い。これは、植え替え直後は根や葉が痛むことで開花しなくなるためである。数年間栽培することから、培養土は1年程度ですぐに崩壊する野菜用培養土よりも、一般的な観葉植物用の培養土や、赤玉土、鹿沼土や腐葉土などの単体の培養土を混合したものが望ましい。本研究では山科植物資料館で標準的に使用している赤玉土、日向土、桐生砂、腐葉土、土太郎(スミリン農産)を2:1:2:1:2を混合した培養土を使用した。

鉢植えの植え替え時期は条件が良ければいつでも良いが、日本では盛夏には萎れやすく、また秋以降はだんだん寒くなり回復が遅くなるため、これらの時期は避けている。本研究では2月に実施した。温室内では冬季の低温はダメージにならないことと、その後の温度上昇で回復を早めるためである。植え替えではストロンを切り取り、株を整理する。親株が元気であれば残す。親株の地下にある茎(図1-1D)は古くなると腐ってくるので、手で取れる部分は除去する。親株は地下の茎が長くなったり、ストロンが増えて根が少なくなったりすると弱ってくる。親株が弱ってきた場合は、ストロンから生じた小株と交代し新たな親株とする(図1-1D)。増殖が目的の場合は小株を新たな鉢に植え付ける。子株を植える場合は発根程度に応じてストロンを2、3cm(十分に発根している場合)から5 - 10cm(葉だけで根が少ない場合)残している。植え替え時には土と一緒に根が多数切れてしまうため、植え替え直後は生長が止まり、萎れやすくな

る。葉が萎れやすい場合は展開した葉を全て切り落とすことで、回復が早まる。2月に植え替えた場合、8から9月頃に再び花が見られるようになるが、完全に回復するのは翌年の5月頃である。

増殖はストロンから得られた小株の株分けと、種子により行う。小株の株分けは上述の通りである。種子繁殖は果実を収穫し、種子を取りだして洗ったら直ちに播くのが最も良い。種子を乾かすと発芽させるのは難しい。種子の保存期間は洗浄後に乾かして冷蔵庫で1から2か月程度だと思われる。発芽が難しくなるのは種皮が固いため、種皮を傷つけると発芽しやすくなるが、傷の付けすぎで腐敗するリスクも高まる。無菌播種を行う場合は、無菌施設内で紙やすりや海砂などで種皮を傷つけると発芽させやすい。種子から開花までは通常3から4年かかる。

温室における年間の花の数

クルクリゴの花は、温室では年間を通して開花する様子が確認できた(図2-1)。そして、1つの花は朝に開花し昼頃には閉じている1日花であった。個体当たりの花の数は1日の最低温度と強く相関することが示され、最低温度が20℃近くになる期間においては、開花数が顕著に減少する様子が観察された(図2-1)。

その後の観察で、花は時期が進むにつれて、花序の基部から先端へ向かって徐々に開花することがわかった(データは示さない)。また最低温度20℃付近では、植物体においては新しい花序の発達が見られず、冬の間が開花した花については、夏に伸びた花序において咲き残った花が咲いていることも明らかになった。

雌蕊と雄蕊の大きさ

雄蕊・雌蕊の長さ、柱頭の幅については、図2-2Aに模式的に示すように計測を行った。それぞれの花における雄蕊・雌蕊の長さに着目すると、外見的な特徴から大きく2種類に分類できた(図2-2C)。現時点での知見を勘案した理解では、雄蕊よりも長い雌蕊を持っている花は両性花、雄蕊よりも短い雌蕊を持っている花は受精できない雄花であると推定された。

図2-2Bには、各々の花序において最初が開花した日を基準とし、経過日数と雌蕊・雄蕊の大きさについて記録した結果を示した。その結果、クルクリゴの花の雌蕊の大きさは、主として花序の中での位置に左右される様子が観察された。花序の低い位置で開花した花は両性花となる傾向が強く、花序の高い位置でより遅く開く花は雄花である傾向が強かった。全体としては開花後およそ20日の時点で両性花から雄花に急激に変化したが、雌蕊長は両性花・雄花ともに期間が経るに従って徐々に短くなる様子が観察された。また、柱頭の幅の減少は、両性花が雄花に変化する時期における雌蕊長の減少と、強く相関する様子も観察された(図2-2B)。一方で、雄蕊

の長さは花の位置によって減少する傾向であったが、その変化は雌蕊長の変化と比較すると非常に小さく、両性花から雄花を通じて一定の範囲内に収まった。

雌蕊と雄蕊を測定した 9 個体 25 花序の花と両性花の開花期間と数を、それぞれ記録した結果をまとめたものを表 2-1 に示した。開花期間と花の数の両方は個体によって、あるいは開花時期や花序によって、様々であった。これは言い換えれば、大きな株では多数の花をつける大きな花序を出すとは言い切れず、多数の花をつける花序も出すし、少数しか咲かない花序も出る、と解釈できる。両性花の最短期間は 25 花序の中で 7 日である一方で、両性花の最長期間は開花後 44 日であった (表 2-1)。ただしこれら 9 個体以外の株では、46 日目に両性花を開花し、結実したものも存在した (図 2-4)。

しかし例外的に、25 花序の内の 2 花序において、雌蕊の長さが減少しなかった。それらの雌蕊の長さは、両性花から雄花に変化した後に再び長くなった。これらの珍しい状況であっても、柱頭の幅は小さくなり続けた。これらの観察の結果、クルクリゴにおける両性花から雄花の変化は、通常、雌蕊の長さと同様の減少を伴うことが明らかになった (図 2-2B)。

9 個体の 25 花序の平均で、一つの花序は 26.6 個の両性花をつけたが、これは一つの花序における全ての花の 22 % に相当するという結果となった (表 2-1)。花序の他の花は雄花であった。表 2-1 からさらに 11 花序を加えた 36 花序で 1 日の花の数を集計した (図 2-3)。花数は花序の最初の開花から 6 日目から 25 日目に増加し、その後は減少し続けた。開花初日後 11 日目から 15 日目において最も多数の両性花が開花し、この期間には平均して 1 日に 1.3 個の花が開いた。一方で、雄花の数は 31 日目から 35 日目にピークを迎え、1 日に 1.2 個の花が開いた。

他家受粉と自家授粉による和合性

人工授粉実験の結果、他家受粉においては、2003 年 7 月から 10 月の 15 個体に 382 の花を受粉して 172 個の果実が得られたので、結実率は 45 % となった。一方、自家受粉においては 12 個体の 301 授粉に対して 12 果実が得られたので、結実率は 4 % となった。すなわち、他家受粉の結実率が自家受粉の結実率よりも約 10 倍高いことが示された。

さらに、1 つの果実における種子数は、他家受粉では 36.0 ± 2.1 個 ($n = 77$ 。172 果実の内からランダムに選抜した 77 果実の結果) である一方で、自家受粉では 17.2 ± 6.3 個 ($n = 12$ 。12 果実全ての結果) であった。従って、自家受粉の種子は他家受粉よりも有意に少ないことが判明した ($P < 0.01$)。

果実を得られる条件

2004 年 12 月まで他家受粉実験を行い、15 個体の 144 花序から 1622 個の両性花に授粉した。

これらの結果を図 2-4 に示す。結実率は、開花後 1 - 5 日が最も高かった。開花日ごとの結実率は、花序の開花日以降、徐々に低くなっていった。全体としては、花序に多くの花が開き、結実率も高い 15 日目までに受粉した場合に、多くの果実を得ることができた。

15 日目より後の花から得られる果実の数は、開花数と結実率の両方が小さくなることが要因となり、継続的に低下した。しかしながら、両性花が存在する最後の時期まで通じて結実する花も存在していた。

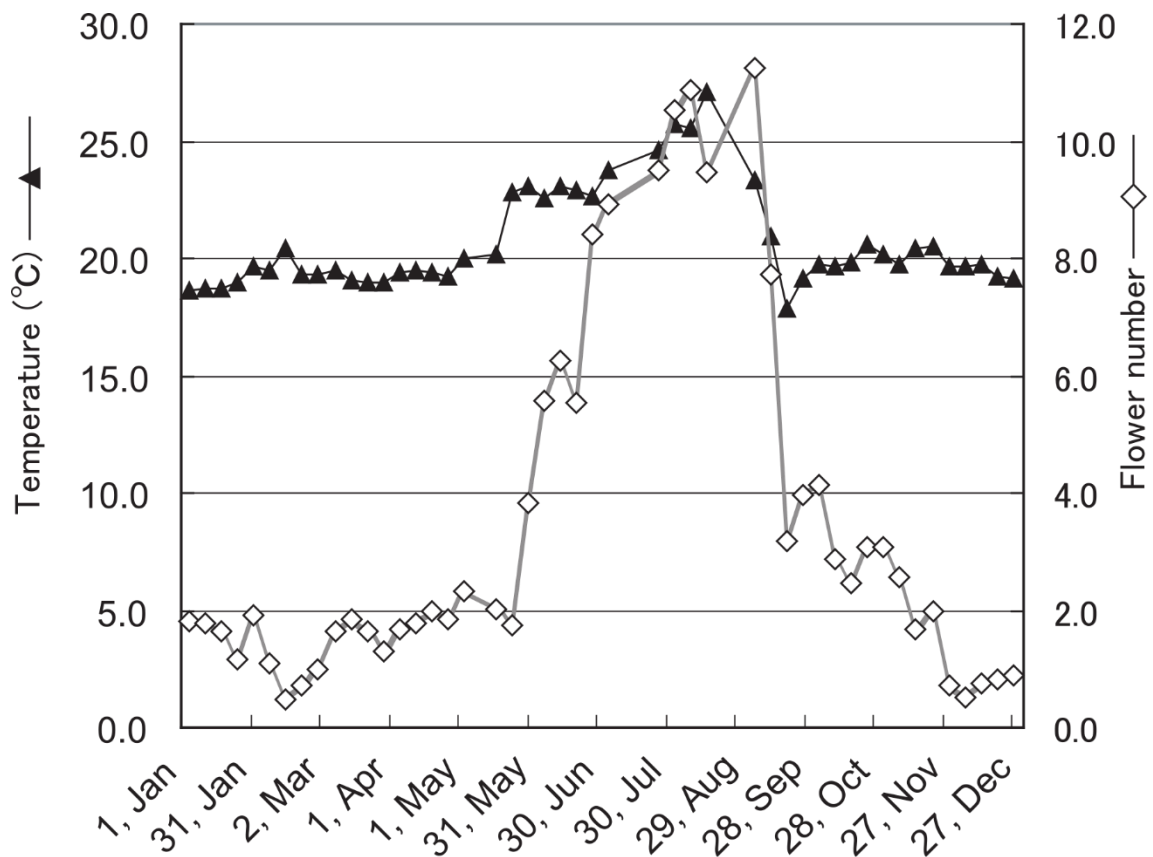


図 2-1 2006 年の温室内温度とクルクリゴの開花数

▲は最低気温、◇は 1 個体の花数を示す。各々 1 週間の平均値を示した。

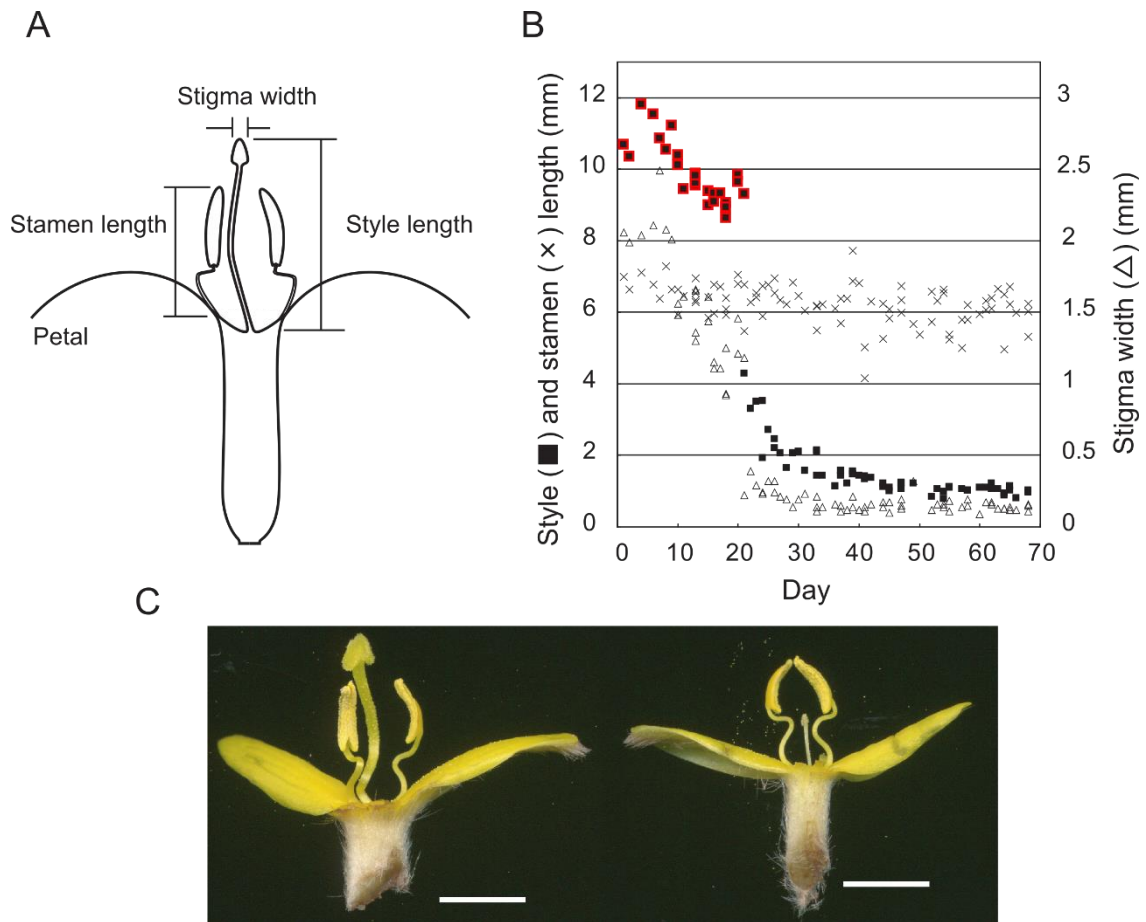


図 2-2 クルクリゴの花

(A) 花弁、雄蕊の長さ、雌蕊の長さ、柱頭の幅を示す模式図。

(B) 1つの花序における花の組織の大きさ。Dayは花序の最初の花が咲いた後の日数。■、×、△は、それぞれ雌蕊の長さ、雄蕊の長さ、柱頭の幅を示す。雄蕊(×)よりも長い雌蕊をもつ花を両性花と判定し、これらの雌蕊(■)を赤枠で囲った。

(C) クルクリゴの両性花(左)と雄花(右)。雌蕊、2枚の花弁、2つの雄蕊を残し、他の組織は除去した。白線の長さは1cm。

表 2-1 クルクリゴの花序における開花期間と全ての花数、両性花(Bisexual flowers)の数。
2003 年 5 月から 2005 年 1 月までの 9 個体 25 花序から集計した。

	Flowering period (day)			Number of flowers		
	All flowers		Bisexual flowers	All flowers		Bisexual flowers
mean±S.E.	102 ± 5.4	20.2 ± 1.8	122.4 ± 6.5	26.6 ± 2.4		
range	67 - 160	7 - 44	61 - 190	7 - 55		

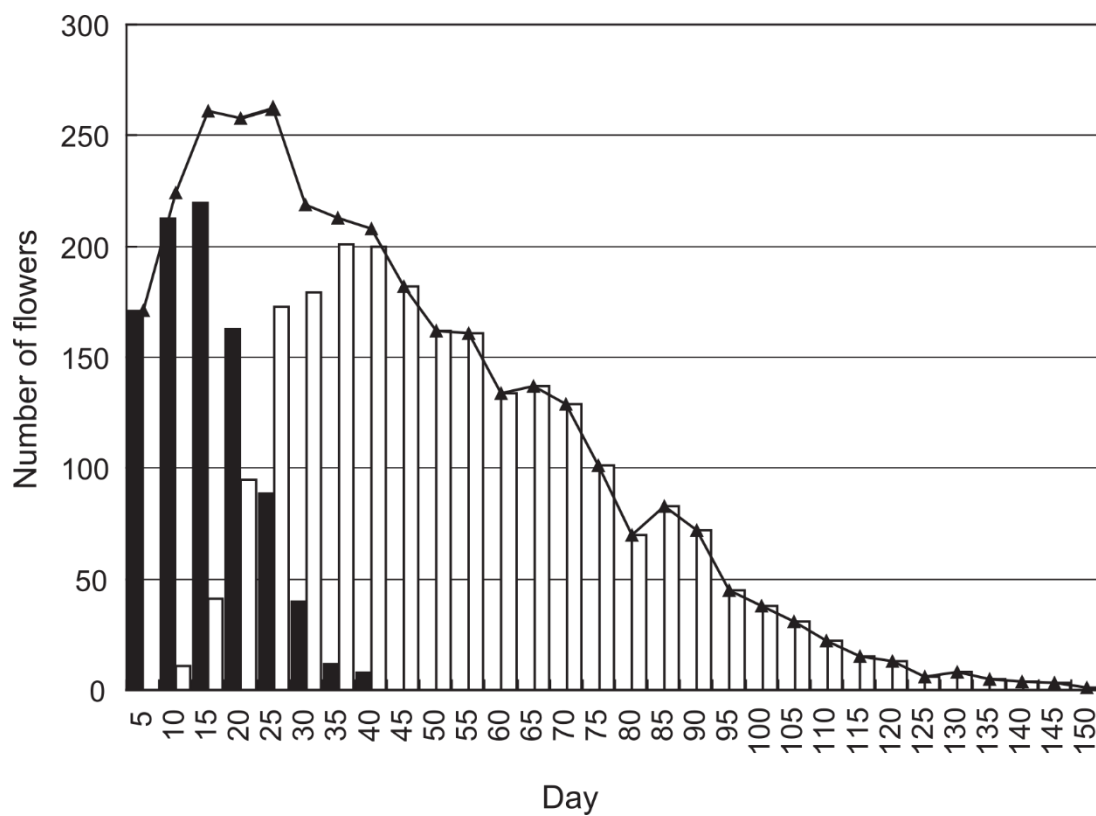


図 2-3 初開花後の両性花および雄花の総数

Day は花序の最初の花が咲いた後の日数を示す。9 株 34 花序の両性花 916、雄花 2322、合計 3238 花を集計した。黒いバーは両性花の数、白いバーは雄花の数、▲は花の総数を、それぞれ示す。

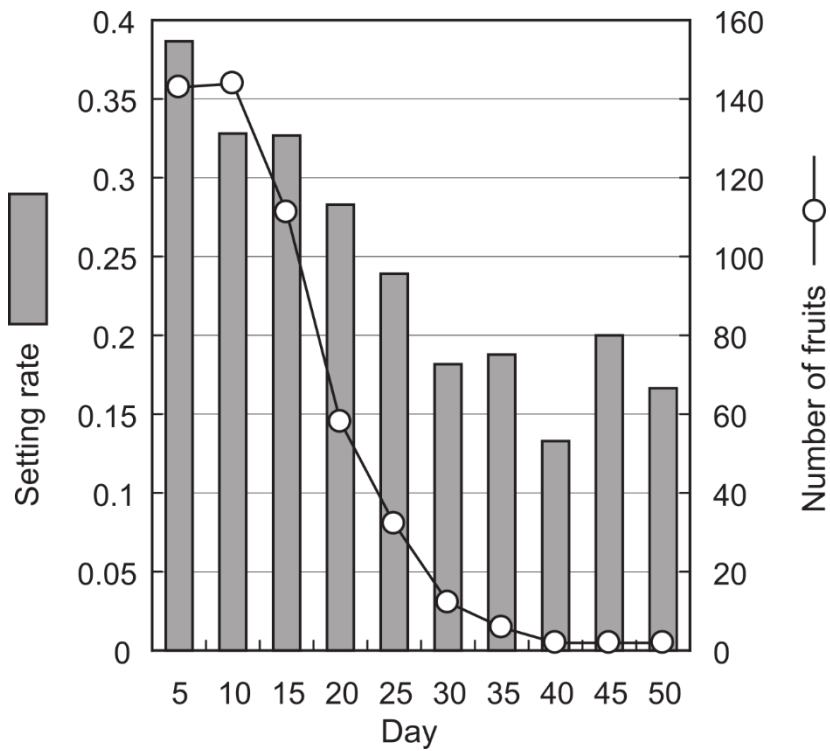


図 2-4 他家受粉によるステージ毎の花の結実率

Day は花序の最初の花が咲いた後の日数を示す。○は結実した果実の数を示す。2003 年 6 月から 2004 年 12 月までの 15 個体、144 花序の 1622 の両性花の結果を集計した。

なお、原著論文 (Okubo et al., 2010) では開花後 50 日の結実率が欠落していたため、ここで訂正する。

考察

結果の冒頭に記述したように、クルクリゴの栽培自体についてはある程度のノウハウが蓄積し、温室での栽培は可能となっていた。そこで本研究では、栽培条件下のクルクリゴ植物体における果実生産を確実にを行うために、花の構造観察と人工授粉方法の検討を中心に検討を行った。その結果、1つの花序には60 – 190個（平均122個）の花が付き、その内の22%（7 – 55個、平均27個）が両性花であることが明らかとなった（図2-3）。結実率は開花後5日目が最も高く、結実数は開花後13日が最も多かった（図2-4）。他家受粉と自家受粉では、他家受粉の方が有意に結実率・結実数が高かった。今回、解析に使用した植物は、オリジナルの3株からランダムに分割されながら維持された植物体である。従って、同じクローンである母植物と娘植物の間で不和合が起こったことが強く推定された。たとえ花粉がランダムに選ばれたとしても、ある程度の花粉は授粉した雌蕊と同じクローンであるかもしれない。この場合、果実ができることは困難である。適切な花粉親を選ぶことで45%以上の結実率を達成することも可能であると推定された。

クルクリゴの花序は、最初のうちに咲く花は雌蕊と雄蕊の明らかな両性花であるものの、その後は雌蕊が退化した雄花に変化する雄性両性花であることが改めて確認された（図2-2）。両性花の期間は平均20日で、その後の数日で急激に雄性花に変化するという現象が観察された。

クルクリゴは1年中開花することから、日長の影響はないものと推定された。一方で、開花数は温室の最低、平均、最高室温のどれとも高い相関はないものの高くなるほど開花数が多い傾向にあった。また、新しい花序の発達も、1株をインキュベータ内で栽培した場合に気温に左右されている様子が観察された。開花数がどのような環境要因で変化するかは、人工気象器内で日照時間と温度を個別に制御して高温短日や低温長日などでの開花数を検証する必要があるが、クルクリゴの植物サイズでは大きな装置が必要なため実現できなかった。現状では、日本での開花には20℃以上を維持することが好ましいと思われた。気温が低くなると新しい花序が伸びてこなくなるため、それ以前から開花を続けている花序の雄花ばかりが開花した。春から夏にかけて新たな花序が発達し、両性花が開花した。このため、日本においては夏から初秋にかけて両性花が開花し、それらが結実して秋から冬の初めに収穫されるという、周期的な開花結実になっていた。

雄性器官と雌性器官の機能の時間的な違いは雌雄同株や両性雄性同株の分類群で一般的な特徴である(Traveset & Jakobsson, 2007)。若い花序は主に両性花であるが、雄花は花序の発達によって増加した。しかしながら植物全体では両性と雄性の花を同時に持ちうる。両性雄性同株の雄花はポリネーターを引きつける機能を持つことが示唆されていて(Dai & Galloway, 2012;

Podolsky, 1993; Toji et al., 2020)、例えば両性雄性同株の *Pseudocymopterus montanus* (セリ科) の多くの雄花は花粉提供者として機能している(Schlessman et al., 2004)。さらには、ツクサでは、雄花は完全花(両性花)よりも小さい一方で、完全花よりも多くの花粉を生産しポリネーターに提供することで限られたリソースでも受粉の成功可能性を高めている(Murakami et al., 2022)。本研究を行った後に、クルクリゴは虫媒であることが報告された(Ismail et al., 2010)。同様に、山科植物資料館の温室でも花に小さなハチが訪れることが観察できた(図 2-5)。クルクリゴの花は大きな葉に隠れて地面すれすれに咲き、ヒマワリやチューリップのように植物体の一番上の目立つ位置で開花する植物ではない。しかし、葉の下に入り込むと株元に多数の花が咲いているのである(図 2-6)。葉の下に花を隠すことで、葉陰に匿われることを好む昆虫を集めているのかもしれない。クルクリゴは雄花を展開する多くの花序を持つことで多くのポリネーターを引きつけることができ、両性の花に花粉を提供する機会を増やしていると考えられる。

今回の結果から、クルクリゴは他家受粉の方が自家受粉よりも結実率が有意に高いことが明らかとなった。しかし、現時点での知見では、このことが自家不和合性を示すとは断定できなかった。自家不和合性は自己の花粉と非自己の花粉を識別して受精を妨げるものである(Jany et al., 2019; Kao & Tsukamoto, 2004; Muñoz-Sanz et al., 2020)。これを判別するには、果実中の種子数だけでなく、受精の有無の判別、花柱における花粉管伸長の観察、自家受粉で得られた種子の相互交配性といったものを検証する必要があるだろう。クルクリゴはストロンによって娘植物を増やして集団を作る。従って種子繁殖は、クローンではない遺伝的な多様性を得るために重要である。仮に原著論文で考察したように自家和合性であるならば同花授粉が頻繁に起こり、たとえ他家受粉したとしても花粉親がストロン由来のクローンであれば同花授粉と同じ事になってしまう。これでは遺伝的な多様性は確保できない。クルクリゴが自家不和合性であるのは理にかなっていると考えられる。一方で栽培する立場では、自家不和合性は結実率を低下させる要因となる。受粉の効率を上げるために、クローンではない履歴の確かな株を配置して他家受粉を促すような栽培の工夫が必要となってくるであろう。また、自家和合性の変異体探索や、突然変異の誘導のような、積極的な方法も考えられるだろう。

次章で述べるように果実におけるネオクリンの濃度は、果実の大きさにかかわらずほぼ一定であった(図 3-2)。ネオクリンタンパク質を効率よく果実から得るためには、個体当たりの果実重を増やすことが重要である。このためには、多数の果実を着けること、また大きな果実を育てることという、2つの方法が考えられる。現時点では収穫個数と果実重の最適なバランスは明らかではなく、今後の課題である。本実験での観察は、花序の早い段階で高い結実率が達成可能な両性花を選び、他家受粉のための適切な花粉親を選択することが、クルクリゴの多くの果実を

得るために重要であることが示された。



図 2-5 クルクリゴの花に訪れた小型ハチ類



図 2-6 葉の下の広い空間で地面近くに開くクルクリゴの花

第3章

クルクリゴの果実に含まれるネオクリンの 分布と含量の解析

序

2章に記載の通り、温室栽培条件下において、効率的にクルクリゴを結実させる方法が明らかとなった。一方、結実した果実について、個体の栽培を継続して観察し続けると、果実は成熟に伴い緑色から白色へと変化する。果肉が軟らかくなるまで成熟すると、手で触れると抵抗なく株から外れるようになる。この時点が完熟期であると想定される。さらにこの状態をそのまま放置すると、果実は褐変し腐敗してしまう。

結実したネオクリン果実はこのような成熟ステージを経るが、外見から判断できる果実の成熟度合いと、果実中に含まれるネオクリンタンパク質の含量の増加が一致しているかについては、明らかではない。授粉後4週間でネオクリン量がピークに達するという報告が存在するものの(Nakajo et al., 1992)、山科植物資料館で栽培している個体を観察していると、果実の成熟には通例、開花から1か月以上かかっている。つまり、実際に果実の成熟にどのくらいの時間がかかるのかも、明らかになってはいないのである。

また、果実内におけるネオクリンタンパク質の分布についても、これまでに知見はないままであった。果実を実際に食してみると、先端近くの嘴部は甘味が弱く、種子の多く含まれる膨らんだ基部は甘みが強い。しかし、ネオクリンの分布が、果実の甘味強度と関連しているのかについても、これまで確認されてこなかった。

以上のような背景から、ネオクリンの果実内の分布や蓄積場所を知ることは、ネオクリンの果実による生産や、ネオクリンの果実内での性質や役割を推定するために役立つことが想定される。そこで本章では、果実の成熟ステージごとのネオクリン含量を測定し、含量が最大となる時期を決定することを試みた。また抗体染色を行い、果実のどの部分にネオクリンが蓄積されるのかを解析した。さらには、果実から得られたネオクリンの各サブユニットにおける糖鎖修飾の有無について判別するため、糖タンパク質染色についても実施した。

なお本章に記載の結果については、Okubo et al. (2008)にて報告した

材料および方法

植物材料と栽培状態

山科植物資料館の温室で栽培しているクルクリゴ 3 株を、材料として用いた。植物は直径 30 cm、高さ 50 cm のプラスチック鉢で栽培し、第 2 章と同じ混合培養土を使用した。1 か月に 1 度の割合で 1000 倍希釈の液体肥料（ハイポネックス）を投与した。温室の気温は 11 月から 5 月までは電気式ヒーターで 20 °C 以上に制御し、6 月から 10 月は温室の窓を開けた。年間の平均気温は 23.4 °C だった。湿度と光条件は制御しなかった。

クルクリゴ果実のネオクリン含量解析

全ての果実は人工授粉を行ったものであり、受粉後 12 週までの期間、2 週間間隔で採集した。種子と果皮を除いた果実から果肉を取り出した。

およそ 0.1–0.2 g の果肉に対して、0.5 mL の 0.5 M NaCl を加えて可溶性タンパク質を抽出した。抽出液に 2 メルカプトエタノールを含む SDS-PAGE サンプルバッファーを適量加えた。標品とした粗精製ネオクリン(Shirasuka et al., 2004)とともに、20 μ L の抽出液を SDS-PAGE にアプライした。ゲルは CBB で染色し、染色後のゲルをスキャナーで画像取得後、ImageJ ソフトウェアでネオクリンに対応するバンドを定量した。

抗 neoculin 抗体の調製

NBS と NAS の C 末端側 16 アミノ酸残基に相当するペプチド配列（それぞれ V¹²²LYSLGPNCGRRVNGG¹³⁷ と G¹²⁰PVLWPLGLNGCRSLN¹³⁵）を化学合成した。合成ペプチドをヘモシアニンと結合させたものを抗原とし、ウサギに免疫して抗血清を得た。その後、抗原ペプチドを結合したエポキシ活性化 Sepharose 6B カラムを用いて、抗血清から抗 NBS 抗体と抗 NAS 抗体を精製した。

果実の抗体染色

個体番号 2-2 から 2005 年 5 月 24 日に収穫した、開花後 10 週間育成した果実 1 個を用いた。1 章に記述したように開花期間は午前中の半日であり（図 1-2B）、開花日と人工授粉を実施する日は同じであることから、人工授粉後の経過時間をこれ以降では開花後と記述する。種子を除いた果実を、10% ホルマリン、5% 酢酸および 50% エタノール中で固定した。その後パラフィンに包埋し、厚さ 6 μ m で切断した。切片はキシレンで脱パラフィンし、エタノールとトリス緩衝生理食塩水/Tween-20 (TBST)で脱水した。内性ペルオキシダーゼ活性を Protein Block (Dako Tokyo, Japan)でブロックした後、3% H₂O₂を含むメタノールで 15 分間インキュベート

した。その後、切片を抗 NAS 抗体と反応させ、4 °Cで一晩インキュベートした。TBST で洗浄後、Biotin blocking system (Dako Tokyo, Japan) および 600 倍希釈のビオチン結合ヤギ抗ウサギ Ig (Dako Tokyo, Japan)を用い 30 分間室温で処理した。続いてペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンで 5 分間処理した。ペルオキシダーゼ活性はジアミノベンジジンで着色し可視化した。

ウェスタンブロット解析と糖タンパク質染色

果実抽出物と粗精製ネオクリンを SDS-PAGE に供した後、ウェスタンブロット解析を行った。ウェスタンブロット解析は抗 NAS 抗体、抗 NBS 抗体のそれぞれを用いて行った。

また粗精製ネオクリンについては二次元電気泳動も行い、泳動後のゲルは Pro-Q Emerald 300 Gel Stain Kit (Molecular Probes)で染色した。N 末端アミノ酸配列は Procise 491 cLC protein sequencing system (Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して解析した。

結果

クルクリゴ果実の生長

開花後のステージ毎の果実の外観写真を図 3-1 に示した。開花後 2 週間を経過した果実の表面の色は白いものの、開花 4 週後から 10 週後では緑に変わり、その後開花 12 週後には白または淡い黄色を示した (図 3-1A)。果実中に存在する種子の種皮については、開花 2 週後から 4 週後ではピンク色であり、開花 8 週後から 10 週後では黒色だった (図 3-1B)。種子および種皮は、開花 8 週後までは柔らかく、種子が未成熟であることが示唆された。開花 10 週後、果実は成熟し、種皮は手をつぶせる程度の固さになった。

果実の平均重量は徐々に大きくなり、開花 10 週後で最大に到達した。供試した果実の重さは成熟ステージとは相関が低く、元となった植物の系統、花の位置、種子の数によって様々であった。Nakajo et al. (1992) は、温室で栽培した果実の中のネオクリンの量は、人工授粉から 4 週間後に 1 果実あたり 1.3 mg に達したと報告している。しかし、我々が今回観察に用いた果実では、人工授粉から 4 週間後の時期では果実がまだ固く、未成熟であると判断された。果実の柔らかさを考慮すると、授粉後 3 か月後頃が、最も適切な果実の成熟ステージと推定することができた。

果実抽出物のネオクリン含量

開花 2-10 週後に収穫した果実から得られた粗抽出タンパク質を対象に、SDS-PAGE を行った (図 3-2A)。開花 2 週後のサンプルからは、高分子量のバンドが複数認められたものの、ネオクリンサブユニットに相当する分子量付近には明確なバンドが検出されなかった。一方、開花 4 週後には、ネオクリンサブユニットに相当する分子量付近に目視で検出可能なバンドが存在し、8 週目以降は高分子量側に見られるネオクリン以外のタンパク質に由来するバンドがごくわずかにまで減少した。これらの結果より、ネオクリンが 0.5 M NaCl で抽出される果実タンパク質の中で主要な構成成分であることが示された。

成熟期間における果実のネオクリン量を、デンストメトリーを用いて算出した。1 g の果肉に含まれるネオクリンタンパク質量に換算して算出すると、ネオクリンは開花 10 週後まで増加し続け、その後減少するという結果を得た (図 3-2B)。この結果より、ネオクリン果実は開花後 10 週程度で成熟することが示唆された。実際、開花 10 週後に収穫した果実は十分な重さがあり、花序から容易に収穫することができた。

今回の解析から推定すると、ネオクリンタンパク質は成熟した果実の果肉 1 g あたり 1.3 mg 含まれることが分かった。成熟した果実の平均重量は 1 - 2.5 g であることから、果実中のネオクリン総含量は、成熟した果実 1 個あたり 1 - 3 mg と算出される。この量は Nakajo et al. (1992)

で報告された「果実 1 個あたり 1.3 mg」という数値に近似していた。しかし Nakajo et al. は開花 4 週後で成熟したと報告しているが、これは我々の観察結果から求められた成熟期間よりもかなり短かった。この違いについては、使用した植物系統の違いからは解釈できなかった。

クルクリゴ果実のネオクリンの局在性

成熟したクルクリゴ果実におけるネオクリンタンパク質の局在を観察するため、果実の縦断面切片を抗 NAS 抗体で抗体染色した (図 3-3)。抗体染色の結果、ネオクリンは果実の全体で検出されたが、強いシグナルは果実の基部で検出され、染色シグナルは種子のない先端部に向けて弱くなる様子が確認できた。また抗体染色のシグナルは細胞間隙で最も明らかであった。この結果から、ネオクリンが分泌型のタンパク質であることが強く示唆された。

ネオクリンサブユニットの検出

開花 10 週後の果実から得られた粗抽出タンパク質を用いて、抗 NAS 抗体によるウェスタンブロット解析を行った。結果として、13 kDa と 10 kDa の 2 本の主要なバンドが検出された (図 3-4A)。相当するタンパク質の N 末端配列をペプチドシーケンスにより解析してみると、それぞれ DSVLLSGQTL と DSVLLS であり、両者とも NAS サブユニットのアミノ酸配列の一部に一致した。一方、抗 NBS 抗体を使用したウェスタンブロット解析では、11 kDa のタンパク質のみが検出された (図 3-4B)。その N 末端配列は DNVLLSG であり、これは NBS のアミノ酸配列中に存在するものであった。

次いで、粗精製ネオクリンタンパク質を用いて二次元電気泳動を行った。非還元条件では、分子量 20 kDa を示すスポットが、等電点が 6.0 から 8.0 の範囲で複数にわたって検出された (図 3-4C)。一方、還元条件では、等電点が pH 4.0–6.0 と pH 7.5–9.5 を示す 2 つのサブユニットに分離する様子が確認できた (図 3-4D)。酸性の pI を示すサブユニットは 13 kDa と 10 kDa を示しており、塩基性 pI を示すサブユニットは 11 kDa だった。さらに非還元条件で泳動したゲルからタンパク質を抽出し、還元条件で二次元電気泳動を実施してみると、還元条件で粗精製ネオクリンが示したものと同一パターンになることが確認できた (データは示さない)。これらの結果から、クルクリゴの果実中には NAS – NBS のヘテロダイマーが主として存在することが示唆された。

過去の研究で我々は、N 結合型グリコシル化 NAS の存在を発見した (Shirasuka et al., 2004)。そして本研究では、明らかに異なる分子量を示す、NAS サブユニットに対応する 2 本のバンドが検出された (図 3-4A と D)。この分子量の差はタンパク質における糖鎖修飾の有無によって生ずると考えられたため、非グリコシル化 NAS の存在を確認するための糖タンパク質染色を行

った。結果として、13 kDa のタンパク質に由来するスポットだけが検出され、10 kDa のタンパク質に由来するスポットは染色されなかった (図 3-4D)。

これらの結果は、果実由来のネオクリンは主として NAS – NBS ヘテロダイマーから構成されていること、またヘテロダイマーを構成する NAS サブユニットには、グリコシル化と非グリコシル化の両方が含まれていることを示している。

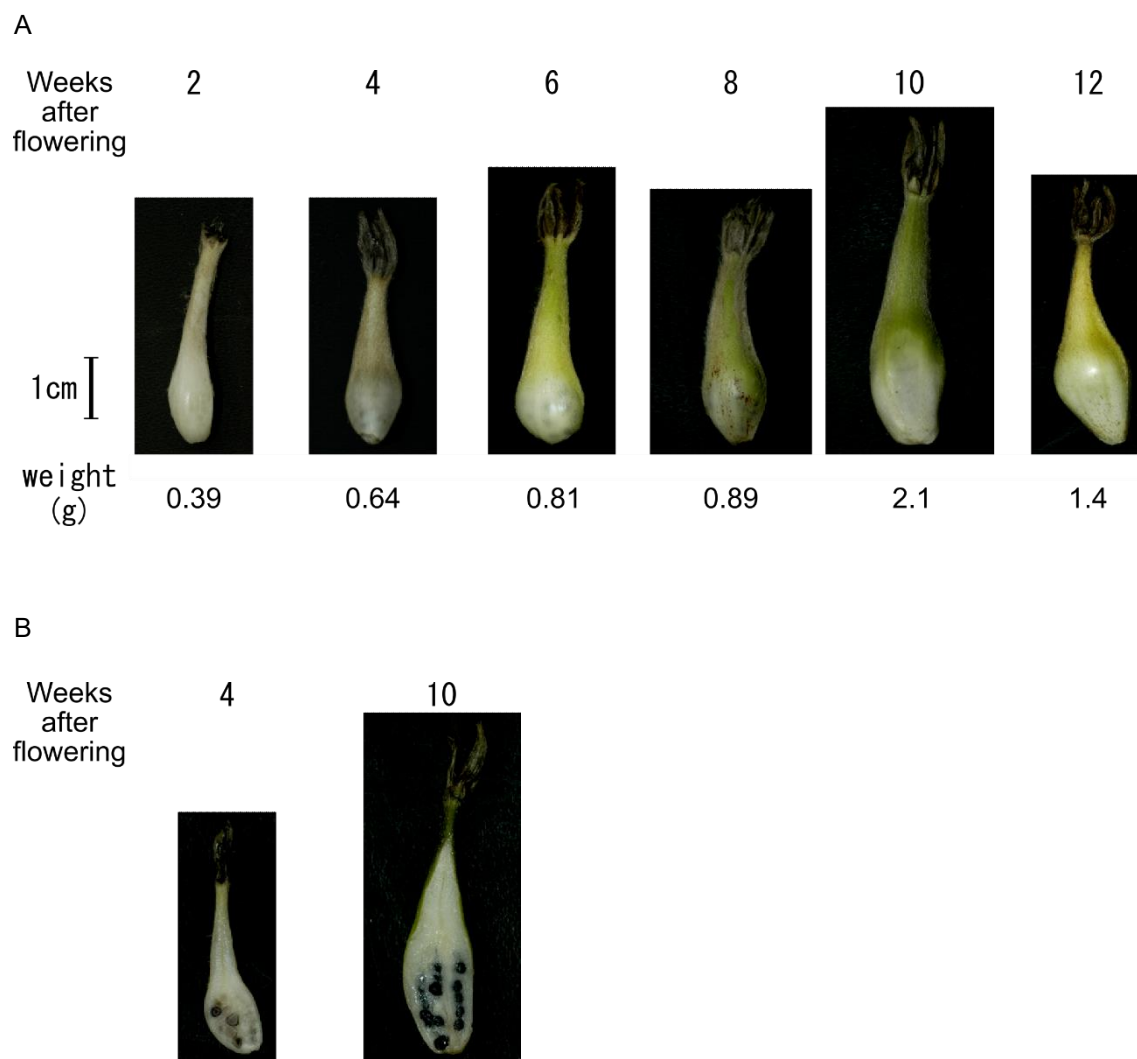


図 3-1 クルクリゴ果実の発育

(A) 開花後 2、4、6、8、10、12 週の果実。

(B) 開花後 4、10 週の果実の縦断面。

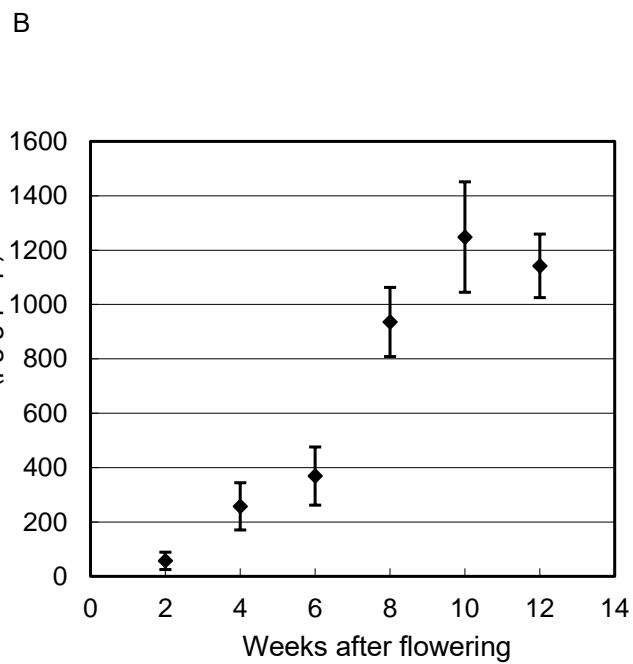
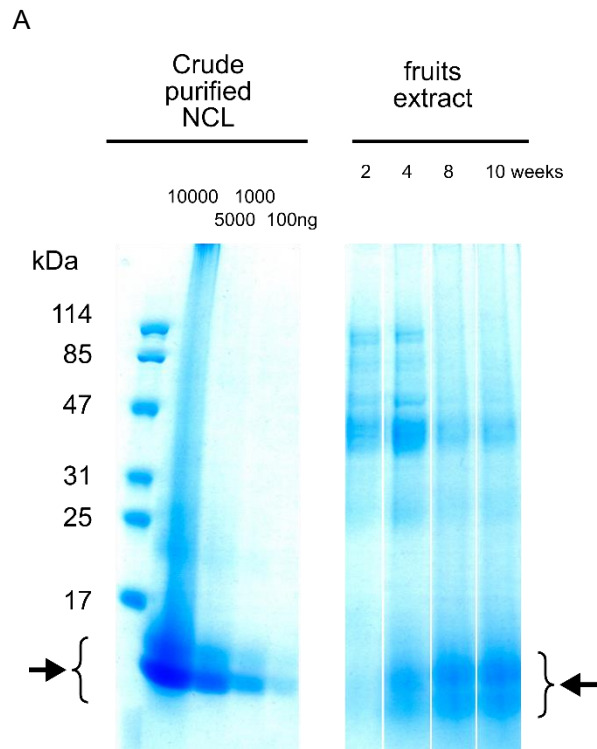


図 3-2 クルクリゴ果実の生長とネオクリン(NCL)収量

(A) クルクリゴ果実抽出物の SDS-PAGE。開花後 2、4、8、10 週に収穫した果実からサンプルを得た。

矢印はネオクリンサブユニットを示す。

(B) 果肉 1g に含まれるネオクリン。(n=9、平均±標準誤差)

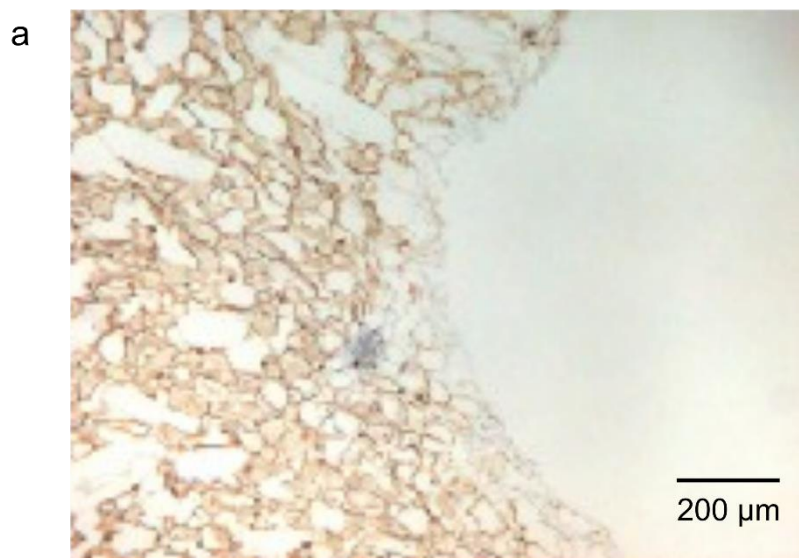
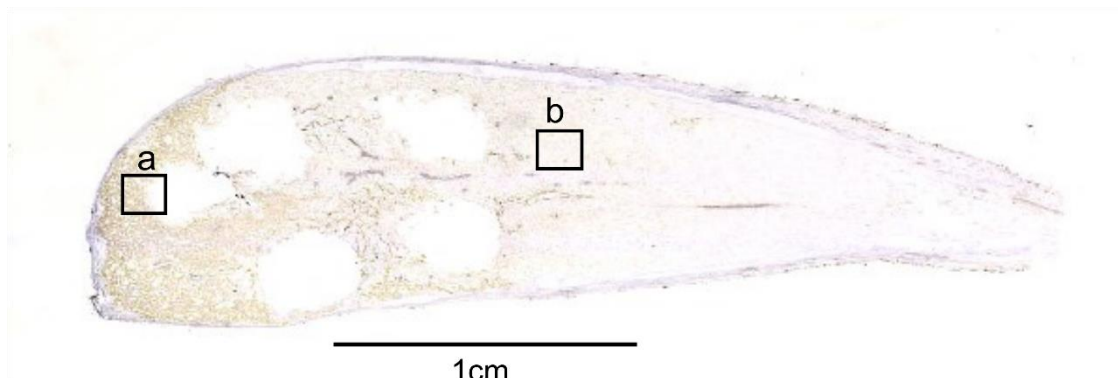


図 3-3 開花後 10 週に収穫したクルクリゴ果実の抗体染色

切片は抗 NAS 抗体で染色し、ジアミノベンジジンで可視化した。切片の拡大像は(a)と(b)に示した。

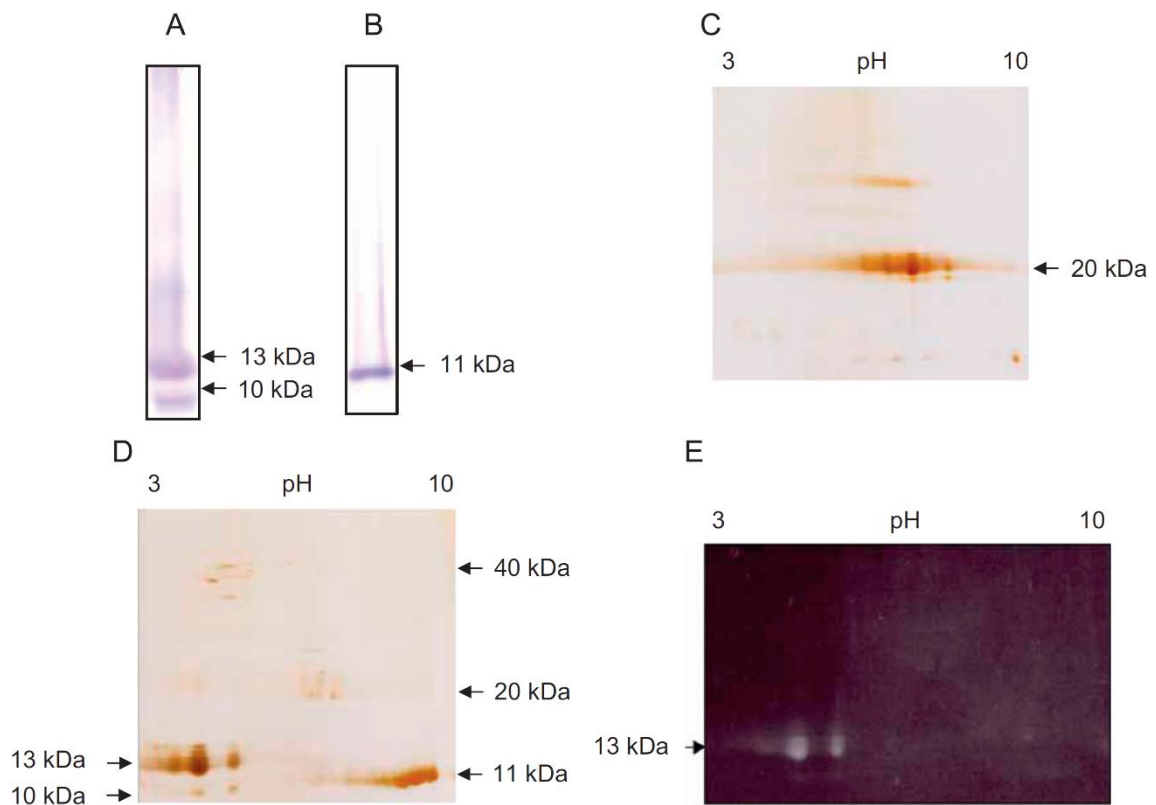


図 3-4 クルクリゴ果実の NAS と NBS の特性

(A と B) タンパク質ゲルブロット解析。タンパク質は PVDF 膜に転写し、抗 NAS 抗体(A)と抗 NBS 抗体(B)で検出した。

(C と D) 粗抽出ネオクリンの二次元電気泳動。非還元条件(C)と還元条件(D)で電気泳動を行い、銀染色によりタンパク質を検出した。

(E) ネオクリンサブユニットの糖タンパク質染色。

考察

本章での解析の結果、外見から判断できる果実の成熟には、人工授粉後 12 週間を要することが明らかとなった。しかし、果実中のネオクリンタンパク質含量は開花 10 週後が最も高いことが示され、この時のネオクリン含量は果肉 1 g につき 1.3 mg であった。また果実中のネオクリンは果実の全体にわたって存在したが、特に基部に近い細胞間隙に多く含まれることが明らかとなった。糖タンパク質染色では、本果実にはこれまで報告されていた N 結合型グリコシル化 NAS の他に、非グリコシル化 NAS が存在することも明らかとなった。

この研究では、果実中における NAS の非グリコシル化バリエーションの存在を初めて明らかにすることができた。NAS と NBS はアミノ酸配列で 77%、核酸配列で 86 % の相同性を有しており (Shirasuka et al., 2004)、NAS と NBS は遺伝的に同一の起源を有することが示唆されている。NAS のグリコシル化サイト 81NGT83 は、AACGGCCACG から AACGGCAAG への点変異を反映して NBS では 81NGK83 となっている。mRNA レベルでは NAS の核酸配列はある種の微小不均一性がある。我々が検出した新しい NAS 非グリコシル化バリエーションは、グリコシル化サイトでの変異が起こったのか、通常の 81NGT サイトで転写後のグルコシル化の欠損が生じたのか、どちらかの結果であると思われる。確定的な結果を得るためには多数の NAS mRNA バリエーションの詳しい解析が必要である。

ネオクリンは構造的にマンノース結合レクチンに類似しているが、植物由来マンノース結合レクチンのいくつかは抗生活性を持つものもある (Ngai & Ng, 2007)。我々の研究グループでは、ネオクリンにおいて、マンノース結合レクチンが糖鎖への結合を可能にする共通配列を欠くために血球凝集素活性を持たないことを明らかにした (Shimizu-Ibuka et al., 2008)。なおもネオクリンの抗生活性を検討する必要があると思われる。

果実中に含まれるネオクリンタンパク質の含量を測定するために、SDS-PAGE で得られたネオクリン標品と同位置の果実抽出液のバンドサイズを直接比較し、定量するという方法をとった。一方で果実抽出液において、ネオクリンと同位置に別のタンパク質が存在する可能性が考えられる。より正確に測定するためにはウェスタンブロットで得られたバンドのサイズで定量すべきだが、測定する果実数が多いことと SDS-PAGE とウェスタンブロットで得られたバンドによる定量に大きな差は無かったことから(データは示さない)、上記のように簡易な方法をとった。また、タンパク質を定量する方法として ELISA を用いることも考えられる。しかし予備実験をおこなったところ、ELISA では完熟果実の抽出液原液の吸光度がネオクリン標品の最低量の吸光度の 5 分の 1 程度の値となった。実験開始時点の Nakajo et al. (1992) の報告値 (果実 1

個あたり 1.3mg) であれば十分検出できるようにネオクリン標品量を設定し、標品の検出反応は得られていることから、果実抽出液での検出に問題があった可能性がある。本実験では一次抗体に抗 NAS ウサギ抗体、二次抗体に HRP (Horseradish peroxidase) 結合抗ウサギ抗体を用い、発色に OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) を使用した。果実抽出液中の何らかが発色反応を阻害したと考えられるが、SDS-PAGE だけで簡易に定量できると分かったためにこれ以上の ELISA の検討は行わなかった。

また NBS と NAS の等電点の違いから、0.5 M NaCl を用いたタンパク質の抽出効率に差がある可能性がある。図 3-2A、図 3-4A、B に見られるように CBB 染色では NBS のバンドの方が大きくまたは濃く見える一方で、ウェスタンブロットでは逆に NAS のバンドの方が大きく濃くなっている (次章の図 4-10 でも同様の傾向が見られる)。二量体のネオクリンの時点では NBS と NAS が同量抽出されていると考えられるから、CBB の染まりやすさや、NAS の糖鎖によってウェスタンブロットのバンドがスミアになっていることがバンドの大きさの違いとなっている可能性がある。そもそも 0.5 M NaCl によってネオクリンを抽出する操作はミラクフルーツからのミラクリン抽出法を参考に決定されており (山下, 1994)、他の濃度や異なる塩を用いる余地はある。抽出方法の改良で効率の差の問題は解決するかもしれない。さらには、標品であるネオクリン (インドネシアに由来) と本実験で使用したクルクリゴ (マレーシア由来) の 2 種類でしか観察されていないため、他の地域や系統のクルクリゴでは NAS と NBS のバンドの濃度・サイズの差の違いも異なるかもしれない。

果実断面の抗体染色は様々な事情により果実 1 個でしか実施できなかった。複数個体の果実や、さらには経時的な変化も調査する予定で果実の準備を進めていたが、本研究では果たせなかった。経時的な変化を捉える過程で、細胞内外へのネオクリンの移行を確認できれば、次章でのネオクリン遺伝子の発現量を測定する際に経時変化を推定できたかもしれない。また抗体染色であればネオクリンの位置を細胞レベルで把握できるのに対して、果実の基部または先端部、中心部、周辺部などの大雑把に把握する方法として、部位毎に抽出してウェスタンブロットで含有量を測定することも検討できる。細かな抽出作業が必要であるが、切片を固定しての抗体染色よりは簡便であったかもしれない。

粗抽出タンパク質中に含まれるネオクリンタンパク質の含量は、果肉 1g あたりで算出すると 1.3 mg であった。この含有量は、果菜や果物のタンパク質含量が 3 - 20 mg・g⁻¹ であること (文部科学省, 2020) や今回の粗抽出方法も勘案すると、ネオクリンがクルクリゴ果実中で主要なタンパク質であると判断できるほど、高い数値を示すものであった。

クルクリゴ果実の成熟におけるネオクリン量の変化は、一般的な果実における糖類含量の変化 (Dai et al., 2009; Dong et al., 2019; Sarma et al., 2020) やアミノ酸、タンパク質の変化(杉浦ら, 1991; 米森ら, 2015)に似ていた。すなわち、果実の成熟に従って増加した。開花 10 週より後で減少に転じたことは、果実の老化が始まったと推定される(鈴木ら, 1993)。これらの変化は果実の風味に寄与していると考えられ(杉浦ら, 1991; 米森ら, 2015)、未熟時に蓄積されていて成熟時に糖に変換されるデンプンや、同じく未熟時には多く含むが成熟期には呼吸基質として消費されて減少する有機酸とは異なることを示している。従って成熟時に最大となるネオクリンは、捕食者すなわち種子散布者のために生産されている可能性があると考えられる。

ネオクリンのような味覚修飾分子は、ヒトを含む哺乳動物における味覚シグナル機構の分子機序を明らかにする可能性のあるツールになりうる。微生物を宿主として組み換え型のネオクリンを作る方法は 2 つ報告されている。しかし、どちらの方法も十分な量のネオクリンを得ることまでは達成できていない。大腸菌を宿主としたときの組み換え型ネオクリンは、封入体の形で発現生産される(Kurimoto et al., 2007)。一方、麹菌を宿主として生産されるネオクリンは活性体として培地に分泌されるものの、その収量は極めて低い(Nakajima, Asakura, Maruyama, et al., 2006)。従って、果肉に貯蔵させてネオクリンを作る実用的な方法を発展させることは、ネオクリンタンパク質を十分量得るための一つの手法としても重要であると考えられる。

しかしながら、現時点における大きな懸案事項は、栽培で使われるクルクリゴの個体差によって果実の大きさが様々なことである。この植物の野生種の中には、より大きな果実を有するものがあることが知られている。そのような種との交配を試みることは、ネオクリンのより高い収量を達成することにつながるかもしれない。また温室栽培における温度・施肥・明暗間隔のような栽培条件を改善することも、ネオクリンを十分に生産するために必要となってくると想定される。

第4章

クルクリゴとオオキンバイザサの果実における
ネオクリンとネオクリン類似遺伝子の比較解析

序

これまでに記載の通り本研究を通じて、温室栽培条件下におけるクルクリゴの栽培方法および開花結実に関する、新たな知見を得ることができた。これらの技術的改良によって、栽培条件下においても一定数のクルクリゴ果実の収穫が年間を通して可能となった。それにより、研究目的として果実由来のネオクリンを提供するということが、現実的に実施できる状況となってきた。

一方でクルクリゴの植物体について考えてみると、果実中にネオクリンを蓄積することの生物学的役割については、未だもって不明なままである。ネオクリンのアミノ酸配列および立体構造は、ユキノハナレクチン (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) を始めとする GNA ファミリーレクチンと、高い相同性を有することが明らかとなっている (Kurimoto et al., 2007; Shimizu-Ibuka et al., 2006)。しかしながらネオクリンは、GNA ファミリーレクチンに特徴的なマンノース結合部位を欠いているため、レクチン活性を持たないことも示されている (Barre et al., 1997; Harada et al., 1994; Shimizu-Ibuka et al., 2008)。

レクチンは植物にとって、主に生体防御物質や貯蔵タンパク質として機能していると考えられている (De Coninck & Van Damme, 2021)。前章の結果から、ネオクリンが果実の成熟に従って増加することが明らかとなり (図 3-2)、ネオクリンが主要貯蔵タンパク質の一つである可能性が示唆された。しかし、クルクリゴにおいて、ネオクリンの進化的起源に相当する「ネオクリンに類似したレクチン活性を有するタンパク質」が現存しているか (あるいは存在していたか) どうかについて、知見は得られていない。また、クルクリゴの近縁種の植物においてもネオクリンに類似したタンパク質を果実中に有しているのか、あるいはクルクリゴのみがネオクリンを特別に有しているのかについても、明らかではない。クルクリゴ近縁種における、ネオクリンやネオクリン類似タンパク質、GNA ファミリーレクチンの存在の有無に関する知見が得られれば、クルクリゴ植物体におけるネオクリンタンパク質の存在意義について、推定する材料となることが期待される。

そこで本章ではクルクリゴの近縁植物として、日本の多くの植物園で栽培されているオオキンバイザサ *Curculigo capitulata* (Lour.) Kuntze を比較対象として用いることにした (図 1-2)。オオキンバイザサは「カークリゴ」という呼称で一般にも知られており、生け花の材料としても広く流通している。図 1-2 に示した通り、クルクリゴとオオキンバイザサの外見は良く似ており、混同されることもしばしばある。外見を比較すると、クルクリゴの草丈の方がやや小さく、葉が幅広いという特徴を有する。またクルクリゴの花序柄は短く、ほとんど地面すれすれで開花するのに対して、オオキンバイザサの花序柄は 5 – 15 cm あり、地面よりも高い位置で開花す

る。また開花の状況をよく観察したところ、クルクリゴは朝開花して昼に閉じる 1 日花であるのに対し、オオキンバイザサは朝に開花し翌日の夕方に閉じる 2 日花であった。

Kochan *et al.*の葉緑体 DNA に基づくキンバイザサ科の系統解析では、両種は最も近縁ではないものの、ともに *Curculigo*clade と呼ばれる集団に属することも明らかとなっている[(Kocyan *et al.*, 2011)、図 1-3]。本章における解析では、遺伝子発現を解析するツールとして次世代シーケンサー (New Generation Sequencer, NGS) を使用した。NGS を用いたシーケンス解析により、両種の果実で発現する mRNA を網羅的に把握するとともに、それぞれの発現レベルの比較検討を行うことにした。

なお本章に記載の結果については、Okubo *et al.* (2021)にて報告した。

材料および方法

植物材料

クルクリゴは、2章、3章と同じ由来のものを使用した。オオキンバイザサは、内藤記念くすり博物館附属薬用植物園（岐阜県各務原市）から分与いただいた。これらの植物は日本新薬株式会社山科植物資料館で栽培し、実験サンプルに供した。

果実からの RNA 抽出

クルクリゴについては、開花1日目の朝に人工授粉を行った。オオキンバイザサについては、開花1日目と2日目に1回ずつ50 ppmのNAA（ナフタレン酢酸）を施用した。両植物とも、開花からおおよそ60日目に果実を収穫し、直ちにRNA later™ solution (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)に浸漬した。クルクリゴについては2014年10月30日に収穫した1個、オオキンバイザサについては2014年8月29日に収穫した1個をそれぞれシーケンス解析に用いた。浸漬した果実は使用直前まで-80℃で保管した。

上記サンプルを液体窒素内で粉砕した後に、RNA抽出を行った。凍結サンプルからトータルRNAをフェノールSDS法で抽出し、poly(A)⁺ mRNAをmRNA Purification Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)を用いて精製した。

シーケンス解析

次世代シーケンス解析については、北海道システムサイエンス社に委託した。cDNAライブラリーはTruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina, Inc., CA, USA)を用いて作製し、Illumina HiSeq 2500 platform (101 bp read length, paired-end, unstranded)で配列解析を実施した。

取得したシーケンスデータはcutadapt1.1およびtrimmomatic0.32を用いて、アダプター配列、低クオリティ配列（不明瞭な読み取りを意味するNを含む配列）、ならびにQ-valueが20未満の配列を除去した。さらに読み取りが50塩基より短い配列も除去した。残りの高クオリティリードについては、Trinity2.11の既定オプションでアセンブルした。トランスクリプトレベル（転写量）については、Bowtie1.12およびTrinityパッケージに含まれるRSEMを使用し、TPM (transcripts per million) 値として推定した。

配列のクラスタリング

アセンブルされた塩基配列について、NCBI NR、RefSeqのprot-plant、UniProt、イネゲノム、シロイヌナズナゲノムを対象に、E-valueを1e⁻¹⁰未満として比較を行った。BLAST解析は

BLAST version 2.2.31 で実行した。unigenes を得るための CD-Hit は閾値(-c) 0.9 でクラスタリングを実施した。

クルクリゴとオオキンバイザサの遺伝子発現の比較

クルクリゴ果実とオオキンバイザサ果実それぞれの転写物を比較するため、お互いの転写物情報をクエリー・ソースにそれぞれ指定し、BLASTN 検索 (E-value < 1e⁻⁵) を実行して、その結果から最上位のものを選択した。

実際の転写物を定量するためにネオクリンに類似するクルクリゴとオオキンバイザサの 6 つの遺伝子の qRT-PCR を行った。Super-Script IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて 1 μg のトータル RNA から cDNA を合成した。増幅には ABI 7500 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて実行した。温度サイクルプログラムは以下のパラメータで実行した。95°C、2 分で変性の後、40 サイクルの増幅 (95°C で 15 秒、60°C で 1 分) を行った。反応の特異性を確認するため、40 サイクルの後にメルティングカーブを構築した。6 つの遺伝子の相対発現量を、ユビキチン遺伝子と推定されるクルクリゴの L_19431_c0_g1_i2 およびオオキンバイザサの C_20039_c0_g6_i1 を用いて標準化し、2^{-ΔΔCT} 法で計算した。6 つの遺伝子のプライマー配列は表 4-7A に示した。

クルクリゴとオオキンバイザサ果実におけるレクチン遺伝子転写物の同定

クルクリゴとオオキンバイザサ果実の全転写物に対して、各植物レクチンファミリーを代表する以下のタンパク質配列をクエリーとして tBLASTN を実行した (De Schutter et al., 2017)。今回対象としたレクチンのタンパク質配列は下記のとおりであり、スコアが一番高い検索結果 (top hit) を選択した。

- *Agaricus bisporus* (マッシュルーム) agglutinin (UniProtKB/Swiss-Prot: Q00022.3 — ABA),
- *Amaranthus caudatus* (ヒモゲイトウ) agglutinin (GenBank: AAL05954.1 — amaranthin),
- *Robinia pseudoacacia* (ニセアカシア) chitinase-related agglutinin (GenBank: ABL98074.1 — CRA),
- *Nostoc ellipsoforum* (藍藻) agglutinin (UniProtKB/Swiss-Prot: P81180.2 — cyanovirin),
- *Euonymus europaeus* (セイヨウマユミ) agglutinin (GenBank: ABW73993.1 — EUL),
- *Galanthus nivalis* (ユキノハナ、スノードロップ) agglutinin (UniProtKB/Swiss-Prot: P30617.1 — GNA),

- *Hevea brasiliensis* (パラゴムノキ) agglutinin (GenBank: ABW34946.1 — hevein),
- *Artocarpus integer* (コパラミツ) agglutinin (GenBank: AAA32680.1 — JRL),
- *Glycine max* (ダイズ) agglutinin (UniProtKB/Swiss-Prot: P05046.1 — legume lectin),
- *Brassica juncea* (セイヨウカラシナ) LysM domain (GenBank: BAN83772.1 — LysM),
- *Nicotiana tabacum* (タバコ) agglutinin (GenBank: AAK84134.1 — Nictaba),
- the lectin chain of *Ricinus communis* (トウゴマ) agglutinin (GenBank: PDB: 2AAI_B — ricin B)

GNA タンパク質ファミリーの配列解析

Shimizu-Ibuka et al. (2008)により選択された 17 の既知の GNA タンパク質配列を使用した。具体的には、Protein Data Bank より得られた ASA, *Allium sativum* (ニンニク) (1BWU)、GNA, *Galanthus nivalis* (ユキノハナ、スノードロップ) (1MSA)、NPL, *Narcissus pseudonarcissus* (ラッパスイセン) (1NPL)、および GenBank より得られた以下のものを使用した。PRA, *Polygonatum roseum* (AY899824)、PMA, *Polygonatum multiflorum* (Solomon's seal) (U44775)、CMA, *Clivia miniata* (クンシラン) (L16512)、ZCA, *Zephyranthes candida* (タマスダレ) (AF527385)、AAA, *Allium ascalonicum* (エシャロット) (L12172)、ACA, *Allium cepa* (タマネギ) (AY376826); AUA, *Allium ursinum* (ラムソン) (U68531)、THC, *Tulipa hybrid cultivar* (チューリップ) (U23043)、ZOA, *Zingiber officinale* (ショウガ) (AY657021)、ACO, *Ananas comosus* (パイナップル) (AY098512)、AKA, *Amorphophallus konjac* (コンニャク) (AY191004)、DPA, *Dioscorea polystachya* (ナガイモ) (AB178475)、CHC, *Cymbidium hybrid cultivar* (シンビジューム) (U02516)、EHA, *Epipactis helleborine* (アオスズラン) (U02515)。

これら 17 の配列と完全長の転写物から推定された 25 のネオクリン類似タンパク質について、ClustalX を用いてアライメントした。近隣結合法による系統樹は、1000 回のブートストラップ計算で構築・解析した。

生化学的解析

クルクリゴとオオキンバイザサの果実抽出物を使用して SDS-PAGE を行い、泳動後のゲルを CBB 染色で可視化した。またウェスタンブロット解析は、NAS と NBS の C 末端をそれぞれ認識する抗 NBS 抗体と抗 NAS 抗体を用いて実施した。

具体的な作業は以下のとおりである。0.1 g の果肉サンプルに対して 0.5 mL の 0.5 M 塩化ナトリウム水溶液でタンパク質画分を抽出した。この抽出液に 2-メルカプトエタノールを含むバッファーに加え、SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE の後、ゲル中のタンパク質を孔径 0.45 μ

m の PVDF メンブレンに転写した。メンブレンを 5% スキムミルクを含む TBST でブロッキングした後、TBST 溶液で 500 倍希釈した抗 NBS 抗体（あるいは抗 NAS 抗体）中で室温 1 時間反応させた。5 分間ずつ 3 回メンブレンを洗浄後、4000 倍希釈の HRP 付加ウサギ IgG 抗体を混ぜた TBST 溶液で、室温 1 時間反応させた。メンブレンを 5 分ずつ 3 回洗浄後、陽性バンドを Clarity Western ECL Substrate kit (BIO-RAD, CA. USA) で可視化した。シグナルは Luminescent Image Analyzer (Image Quant LAS 4000 mini, GE Healthcare, IL. USA) を使用し、428 nm で 20 秒の露出で検出した。

結果

クルクリゴとオオキンバイザサを対象とした *de novo* RNA-seq アセンブル

Illumina HiSeq2500 プラットフォームを用い、クルクリゴとオオキンバイザサの cDNA ライブラリーをシーケンス解析した。取得データを解析する上で、平均 quality value が 20 未満、長さが 50 塩基未満、不明瞭な 'N' を含むリードをフィルタリングし、解析から除外した。アダプター配列除去と上記フィルタリングを実施したところ、クルクリゴの cDNA ライブラリーから 44,396,896 リード、オオキンバイザサの cDNA ライブラリーから 43,863,400 リードを、それぞれ取得することができた (表 4-1)。

次いで Trinity 2.11 を使用し、クルクリゴとオオキンバイザサの高品質リードをアセンブルしたところ、それぞれ 85,697 および 76,775 のシーケンスコンティグを得ることができた。シーケンスコンティグの平均塩基長は、それぞれ 775 bp、744 bp となった。クルクリゴとオオキンバイザサにおける転写物の N50 値 (配列長の加重平均) は、それぞれ 1324、1205 と見積もられた。さらに CD-Hit を用いた unigene のクラスタリングにより、クルクリゴで 70,371、オオキンバイザサで 63,704 の unigene を明らかにすることができた (表 4-1)。

2 種の *Curculigo* 植物における発現遺伝子レパートリーの概略

De novo アセンブリーで同定された果実由来転写物の機能情報を収集するため、様々なデータベースの核酸配列に対して、全転写物の配列比較を実施した。今回用いたデータベースは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の非重複タンパク質データベース (NR)、RefSeq、UniProt/Swiss-Prot、Clusters of Orthologous Groups of proteins (COG)、イネ (*Oryza sativa*) ゲノム (Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0, Assembly: GCF_001433935.1)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) ゲノム (Assembly: GCF_000001735.4) となっている。これらのクエリーから最上位の結果を対応する遺伝子として選択した。

上記データベースに対し、 $1e^{-10}$ の閾値で BLASTx 検索を実行したところ、クルクリゴでは 85,697 転写物から 38,433 のアノテーション (44.8%) を、オオキンバイザサでは 76,775 転写物から 40,554 のアノテーション (52.8%) を、それぞれ得ることができた。各データベースでアノテーションされた転写物の数については表 4-2 に示した通りになるが、全体として転写物からアノテーションされた割合がかなり低いことが判明した。この理由として、2 種の *Curculigo* 植物は、公共のデータベースに多くの情報が蓄積されている古典的なモデル植物と比較した場合、かなり遠縁であることを示唆しているものと考えられる。

単子葉植物間における遺伝子の保存の程度

NR データベースでのクルクリゴとオオキンバイザサ転写物の BLASTx 検索の後に更に Blast2GO を実行し、異なる植物種に渡って広く保存されている遺伝子の程度を決定した。BLAST 検索で得られた種毎のヒットの数を数え、様々な植物種と 2 種の *Curculigo* に存在する発現遺伝子の類似性を推定した (図 4-1)。クルクリゴとオオキンバイザサの転写物と高い相同性を示した植物のうち、割合が最も高いものから 6 番目までの種は単子葉植物であり、その種類と類似性の順位については 2 つの植物において共通であった。このことは、*Curculigo* が保有する遺伝子レパートリーは、他の単子葉植物の既知の遺伝子と高い類似性があることを示唆するものであると考えられる。

次いで、COG データベース (全ゲノムにコードされているタンパク質配列の全てのオーソログを定義しているデータベース) でアノテーションされたクルクリゴの 11,875 の転写物とオオキンバイザサの 12,448 の転写物について、機能的カテゴリーに分類した (図 4-2)。これらの機能分類に大きな違いは見いだせず、2 種の植物が機能的に同じ遺伝子を保持しているという考えが強く示唆された。さらに、イネゲノムデータベースと比較した際のアノテーション結果を用いて Gene Ontology (GO) 解析による転写物の機能分類も行った (図 4-3)。こちらの分類方法においても、2 種の植物間に顕著な違いは見いだせなかった。この結果からも、2 種植物が保有する遺伝子のレパートリーが、よく知られた単子葉植物の遺伝子レパートリーと非常に類似していることが強く示唆された。

クルクリゴとオオキンバイザサ間に共通に存在する相同性の高い遺伝子群

同定された 2 つの植物由来の unigene 配列を用い、クルクリゴとオオキンバイザサの間における遺伝子の相同性を分析した。具体的には、お互いの全転写物をクエリーおよびソースにそれぞれ指定し、E-value の閾値を $1e^{-5}$ として BLAST 検索を実行した。そしてお互いに共通のベストヒットを選択した。

2 種の植物間で高い相同性のある unigene を common gene、相同性が低いまたは 2 種の植物のうち 1 種にのみ存在する遺伝子を unique gene と定義したところ、全体としてはクルクリゴで 38.6 % (70,371 の内の 27,155)、オオキンバイザサで 42.6 % (63,704 の内の 27,155) の unigene が common gene として分類された (図 4-4)。common gene が比較的少数であることは、これらの種が祖先植物から進化的に分岐してから、かなり長い時間が経過したことを示唆するものである。この仮説については、キンバイザサ科の葉緑体 DNA に基づく系統解析の結果と一致する。葉緑体 DNA に基づく系統解析においては、*Curculigo* 属は一つのクレードを形成するものの、クルクリゴとオオキンバイザサはこのクレードの中で最も近縁の種ではないことが示されている (図 1-3)。

引き続き、COG、RefSeq、UniProt、NR データベース、イネとシロイヌナズナのゲノムを対象に、これらの植物種にアノテーションされた遺伝子の数を調査した (表 4-3)。クルクリゴとオオキンバイザサにおいて、**common gene** の中ではそれぞれ 17,377 **unigene** と 17,199 **unigene** (**common gene** のうちそれぞれ 63.8 %および 63.3 %) がアノテーションされた。対照的に、クルクリゴでのみ見つけられた **unique gene** の中の 11,718 の **unigene** がアノテーションされ (**unique gene** の中の 27.1 %)、オオキンバイザサでのみ見つけられた **unique gene** の中の 14,848 の **unigene** がアノテーションされた (同じく 40.6 %)。従って、アノテーションされた割合は、**common gene** の方が少ないにもかかわらず、アノテーションされた数だけを見ても **unique gene** よりも **common gene** でより高くなった。この結果を説明する仮説の一つは、両種で共通の遺伝子の多くが、利用したデータベースに高く出現する他のモデル植物においてもまた共通な遺伝子であるかもしれない、ということである。

さらに、クルクリゴとオオキンバイザサの 27,155 の **common gene** の発現プロファイルを比較した (表 4-4)。クルクリゴとオオキンバイザサの対応する遺伝子の配列は相同性が高かったものの、各遺伝子の転写量から判断される発現プロファイルについては必ずしも類似しているわけではなかった。27,155 の **common gene** の中の 111 だけが、転写量を示す TPM (**transcripts per million**) 値が 50 以上を示したが、両植物における TPM 値は対応する遺伝子において数値が大きく異なる場合がしばしば見受けられた (表 4-4)。またこれら 111 遺伝子の中、5 つがネオクリン類似遺伝子であったが、いくつかのネオクリン類似遺伝子については 2 植物種の間で発現量が大きく異なることも明らかになった (表 4-4 中の網掛け)。

クルクリゴ果実とオオキンバイザサ果実で発現するレクチン遺伝子

序章にて述べたように、クルクリゴ果実は NBS-NAS ヘテロダイマーからなる味覚修飾タンパク質ネオクリンを含んでいるが、このタンパク質はアミノ酸配列についても立体構造についても、GNA ファミリーのレクチンに類似している。

そこで、クルクリゴとオオキンバイザサの果実で発現するレクチンの数を上記データから検索し、12 のレクチンファミリーごとに分類を行った (表 4-5)。レクチン遺伝子の数を決めるためには、12 の代表的レクチンをクエリーとしてそれぞれの種の全転写物に対して tBLASTN 検索を実行することとした。その結果、両植物種において、最も大きなレクチンファミリーはネオクリン遺伝子 (**NBS** と **NAS**) を含む GNA ファミリーであり、クルクリゴの 45 のレクチン遺伝子の中の 10、オオキンバイザサの 49 のレクチン遺伝子の中の 12 が GNA ファミリーに含まれた (表 4-5 中の網掛け)。

GNA ファミリーの解析およびネオクリン類似転写物

GNA ファミリー遺伝子を、ネオクリン遺伝子も含めて更に詳しく分析することにした。まず、よく知られた GNA ファミリーの 17 転写物と、*Curculigo* 属植物で今回見出された 25 のネオクリン類似転写物 (表 4-6 に示したクルクリゴの 10 とオオキンバイザサの 15) の推定タンパク質配列を用いて、系統樹を構築した (図 4-5、図 4-6)。図 4-5 においては、クルクリゴとオオキンバイザサの転写物 ID の後ろに TPM 値についても提示している。なお、クルクリゴの転写物 L_16562_c0_g1_i1 がコードする推定アミノ酸配列は NBS と一致し、L_16562_c0_g1_i2 がコードする推定アミノ酸配列は 1 アミノ酸置換を除いて NAS と一致した (図 4-7)。そこで以後は、これら転写物を NBS、NAS と見なすことにした。

系統樹において、ネオクリン類似転写物に由来する推定タンパク質は、既知の GNA ファミリーに属するタンパク質とは異なるグループを形成した (図 4-5)。ネオクリン類似配列は、NBS と NAS を含む 1 つのグループ (ここでは「ネオクリングループ」と命名する) と、他に 2 つの大きなグループ (グループ 1・グループ 2) を形成した。ネオクリングループには NBS と NAS に加え、オオキンバイザサにおいて転写物の発現量が極めて多いタンパク質 (C_9931_c0_g1_i1) も含まれた。なお、この転写物のアミノ酸配列中にはマンノースを結合するために重要なアミノ酸残基が保存されており、レクチン活性を有する可能性が高いことが想定される (図 4-6、図 4-8A)。

TPM 値が大きい高発現のネオクリン類似転写物のほとんどがグループ 1 に属していた (L_22219_c0_g1_i1 [TPM: 7600]; C_18595_c_g1_i1 [TPM: 2300]; C_9454_c0_g1_i1 [TPM: 2000])。しかし、これらの高発現転写物については、全体としてはマンノース結合レクチンによく似たタンパク質をコードしているものの、マンノース結合サイトを作る基本的なアミノ酸残基は保存されておらず、マンノース結合レクチンとして機能しないことが推定される (図 4-6)。現時点では、これらの高発現転写物の生理的機能も、それらが高発現である理由についても不明である。なお、グループ 2 の転写物でコードされる推定タンパク質はアマドコロ属の *Polygonatum multiflorum* agglutinin (PMA) と *Polygonatum roseum* agglutinin (PRA) に比較的近かった (図 4-5)。グループ 1 とは異なり、このグループには高発現の転写物はなかった。

それぞれの転写物において、クルクリゴとオオキンバイザサの間で高い相同性を有するオルソログな転写物がほぼ存在していた。それぞれの種に多数のオーソログが存在することは、比較的 common gene の数が少ない (2 種の全転写物のうちおよそ 40%のみである) ことも考慮すると、注目し得ると言える。おそらくこれらのオーソログは、これら 2 種の植物種の分岐以前にも存在し、それらのアミノ酸配列の違いは進化的な分岐後に生じたものと推定される。

一方で、ネオクリングループに属する分子群に着目すると、クルクリゴとオオキンバイザサの両種に NBS と NAS と高い相同性を有するタンパク質をコードする転写物が存在していた (図 4-5)。NBS 遺伝子と NAS 遺伝子はクルクリゴにおいて高発現であるが、オオキンバイザサにおけるそれらのオーソログ(C_16324_c0_g1_i1 と C_16324_c0_g1_i2)についてはわずかな発現量でしかなかった。またクルクリゴにおける NBS と NAS の TPM 値は、それぞれ 650 および 620 であり、およそ同じ数値であった。この結果は、それらがコードするタンパク質がヘテロダイマーを形成するという知見と合致していた。一方で、ネオクリングループに属するオオキンバイザサの C_9931_c0_g1_i1 は非常に高発現であり、TPM 値は 15,000 と今回解析したオオキンバイザサ果実中の全転写物の中で 5 番目に高発現であった。しかしそのクルクリゴのオーソログ (L_307_c0_g1_i1 と L_307_c0_g2_i1) は、非常に低いレベルでしか発現していなかった。RNA-seq の結果を検証するため 2 植物種のネオクリングループ遺伝子の qRT-PCR 解析を行った (表 4-7)。ここでは両種のユビキチン遺伝子をリファレンス遺伝子として発現レベルの比較を行った。クルクリゴにおいて NBS と NAS 遺伝子の発現レベルはほぼ同程度であり、L_307_c0_g1_i1 と L_307_c0_g2_i1 のそれはかなり低かった (表 4-7B)。オオキンバイザサにおいては C_16324_c0_g1_i1 と C_16324_c0_g1_i2 の発現レベルは非常に小さく、C_9931_c0_g1_i1 のそれは非常に大きかった。これらの結果は RNA-seq 解析で推定された TPM 値の結果を支持した。加えて、RNA-seq 解析の結果から得られた両種の発現レベルの高-低関係も qRT-PCR 解析で支持された。

興味深いことに、2 植物種にオーソログのある 3 グループ (ネオクリングループ、グループ 1、グループ 2) の全てのグループで、ある遺伝子が片方の植物で高発現であるならば、もう片方の植物におけるそのオーソログは低発現であり、今回の解析からは 2 植物種でともにオーソログが高発現であるケースは認められなかった。表 4-4 に示されたデータはこのパターンを支持するものである。これらの結果は 2 種の植物の進化的分岐後に、遺伝子発現システムに何らかの変化が生じてしまったことを強く示唆するものといえる。

続いて、ネオクリングループに所属するタンパク質の推定アミノ酸配列のアライメントを行った (図 4-8A)。分泌シグナルペプチドの切断によって除去される領域と、マンノース結合サイト (MBS) に似た領域に着目し、全体のアミノ酸配列を 9 つの領域に分割して示している。それぞれの領域名は、N 末端プロ配列 (N-pro)、N 末端領域 (N-term)、MBS1、inter1、MBS2、inter2、MBS3、C 末端 (C-term)、C 末端プロ配列 (C-pro) である。

His-11 はネオクリンの pH 依存的な味覚修飾活性に不可欠である残基で NBS の N-term 領域に存在しているが、クルクリゴの転写物 L_16562_c0_g1_i1 およびオオキンバイザサの

C_16324_c0_g1_i1 でコードされる推定アミノ酸においてもこのヒスチジン残基の存在が認められた。対照的に、オオキンバイザサの C_9931_c0_g1_i1 とクルクリゴの L_307_c0_g1_i1 および L_307_c0_g2_i1 (以後、これらを C_9931 シリーズと称する) は His-11 をコードせず、NAS と同様にこの残基が Tyr-11 であった。

加えて、NBS と NAS がサブユニットを形成する際に分子間ジスルフィド結合を形成する残基である Cys-77 と Cys-109 は、2 植物種の inter2 領域と C-term 領域に存在した。しかし C_9931 シリーズには対応するシステイン残基は存在しておらず、これらのタンパク質が二量体を形成せず単量体で果実中に存在することが示唆された。

NAS、NBS のヘテロダイマーからなるネオクリンタンパク質がヒトの甘味受容体に結合して受容体を活性化させるには、ネオクリン中の 4 残基が特に重要とされている。すなわち、Arg-48、Tyr-65、Val-72、Phe-94 である。Tyr-65 と Val-72 は C_9931 シリーズでも存在していたが、Arg-48 と Phe-94 に対応する残基は Leu-48 と Val-94 であった (図 4-8A)。C_9931 シリーズが二量体にならないことが想定されることや、His-11 とこれら 4 つの不可欠な残基の一部が異なる残基となっていることは、C_9931 シリーズタンパク質が甘味活性や味覚修飾作用を持たないことを強く示唆する知見となる。なお、予備的な官能試験では、オオキンバイザサの果実は C_9931_c0_g1_i1 が高発現レベルしているにもかかわらず、甘味や味覚修飾作用を示さなかった (データは示さない)。

一方、マンノース結合サイト (MBS) に似た領域については、MBS と同様に C_9931 シリーズの 3 つのサイト (MBS1、MBS2、MBS3) にはマンノース結合に必要なモチーフが保存されていた。このことより C_9931_c0_g1_i1 を始めとする C_9931 シリーズタンパク質はレクチンとして機能することが想定された。

作成したアミノ酸アライメントに基づき、領域毎に 2 つの基準配列 (NBS と NAS) と比べた際のアミノ酸置換の程度を調査した (図 4-8B)。NBS シリーズと NAS シリーズの間で、N 末端から C 末端の全体の領域で 18 から 27 % の置換が起こっていた (NBS の 114 残基のうち 26 残基、23%)。最も高い置換率は 27% であり、場所は MBS2 領域であった。続いて inter2 領域と C 末端領域の 24 % が高い置換率であった。C_9931 シリーズでは、最も高い置換率は C 末端領域で 53 %、続いて MBS3 領域で 44 %、inter2 領域で 43 % だった。これらの結果は inter2 から C 末端の領域が、ネオクリングループの中での配列の多様性が頻発している領域であるといえる。

ここで改めて、ネオクリングループの核酸配列を比較した (図 4-9)。公開データベースの NBS、NAS と今回得られた配列で異なる場所は 6 か所 (71、373、383、387、400、410 番目) であ

り、これらの位置はアミノ酸配列の図 4-7、図 4-8 で示した差異と一致した。つまりアミノ酸配列に変化のない保存的な置換は見つからなかった。

生化学的解析

クルクリゴ果実とオオキンバイザサ果実からタンパク質を粗抽出し、SDS-PAGE を行い CBB で染色した。また抗 NBS 抗体、抗 NAS 抗体を混合してウェスタンブロットを実行した (図 4-10)。

CBB 染色において、クルクリゴ果実のサンプルで NBS を表す 11 kDa バンドと NAS を表す 13 kDa のバンドが明確に検出された (図 4-10A)。オオキンバイザサ果実由来のサンプルでは、11 kDa の周囲のバンドのあるものは、TPM 値が大きい C_9931_c0_g1_i1 にコードされたタンパク質である可能性が高い。

ウェスタンブロットにおいては、クルクリゴ果実では NBS と NAS に相当するバンドの存在が確認できた (図 4-10B)。一方で、オオキンバイザサでは抗 NBS 抗体・抗 NAS 抗体で検出されるバンドは存在していなかった。今回用いた抗 NBS 抗体・抗 NAS 抗体によって認識されるそれぞれの C 末端領域のアミノ酸配列は、C_9931_c0_g1_i1 では大きく異なる。このことは、CBB 染色によって検出されたタンパク質がウェスタンブロットで検出されなかった結果と合致するものである。

表 4-1 クルクリゴとオオキンバイザサ果実の *de novo* RNA-seq アセンブリーの概略

	クルクリゴ	オオキンバイザサ
High-quality reads	44,396,896	43,863,400
Total Trinity genes	69,446	63,951
Total Trinity unigenes	70,371	63,704
Total Trinity transcripts	85,697	76,775
GC (%)	44.0	45.6
N10 (nts)	3,214	2,676
N20 (nts)	2,460	2,103
N50 (nts)	1,324	1,205
Total assembled bases	66,426,868	57,098,016

表 4-2 クルクリゴとオオキンバイザサ果実でアノテーションされた転写物数

Annotated database	クルクリゴ	オオキンバイザサ
COG¹	11,875	12,448
RefSeq	37,922	39,369
Uniprot	36,783	38,901
NR²	37,118	39,340
Rice³	34,761	36,204
Arabidopsis⁴	33,332	34,684
All six databases	38,433	40,554

¹ COG: Clusters Groups of proteins.

² NR: nonredundant protein databases of the National Center for Biotechnology Information.

³ Assembly: GCF_001433935.1.

⁴ Assembly: GCF_000001735.4.

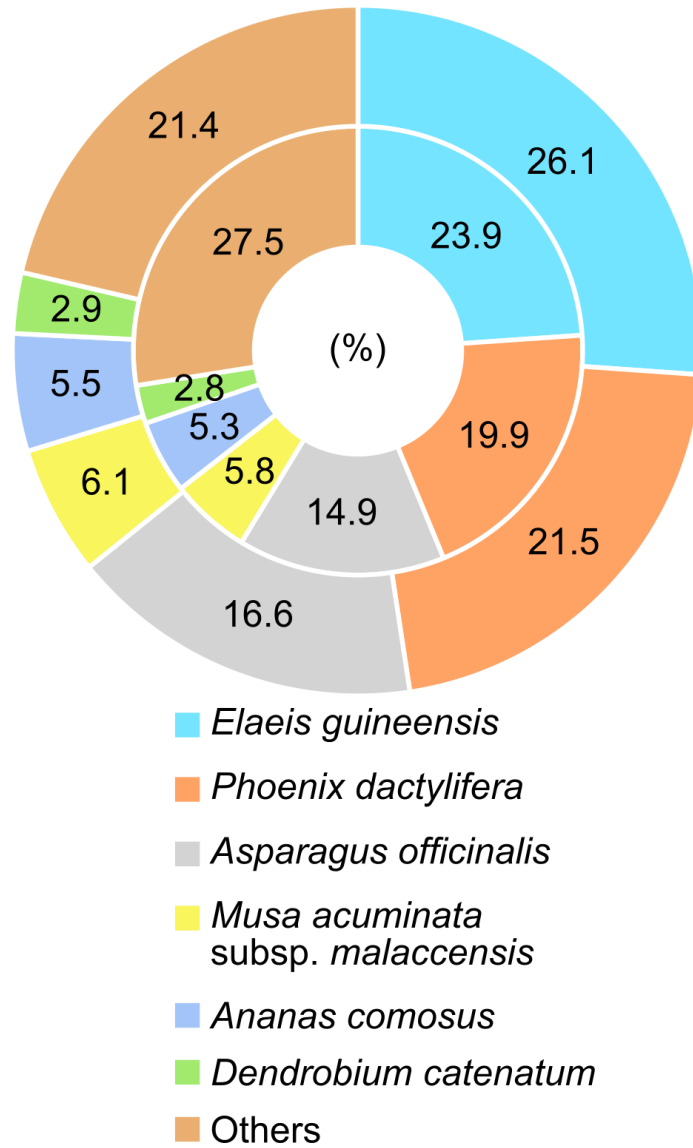


図 4-1 クルクリゴとオオキンバイザサの転写物がアノテーションされた植物種の頻度
 円グラフの外側はクルクリゴ、内側はオオキンバイザサを示す。NR データベースの BLAST 検
 索結果による。

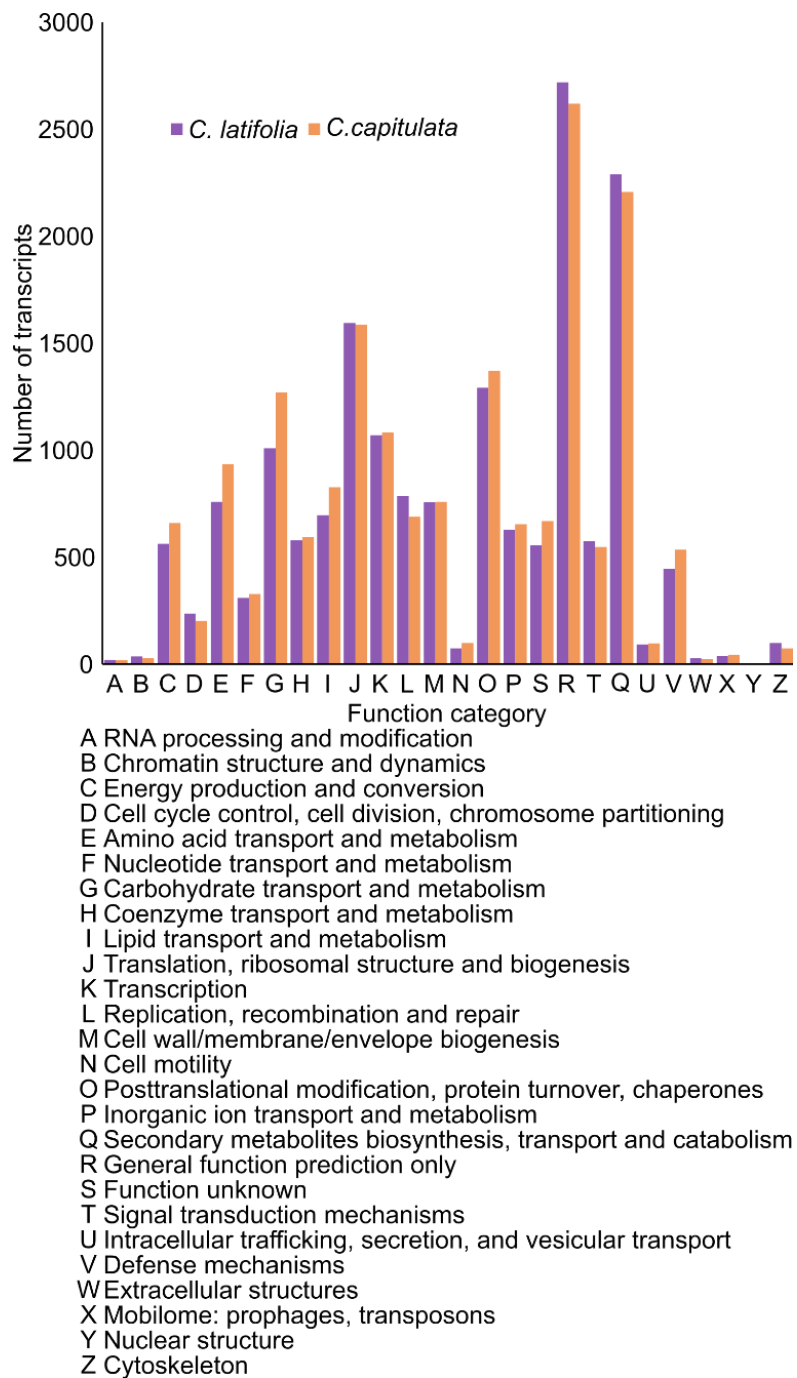


図 4-2 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の果実転写物の COG データベースによる機能分類

クルクリゴの 11,875、オオキンバイザサの 12,488 転写物が 26 の COG カテゴリーに分けられた。

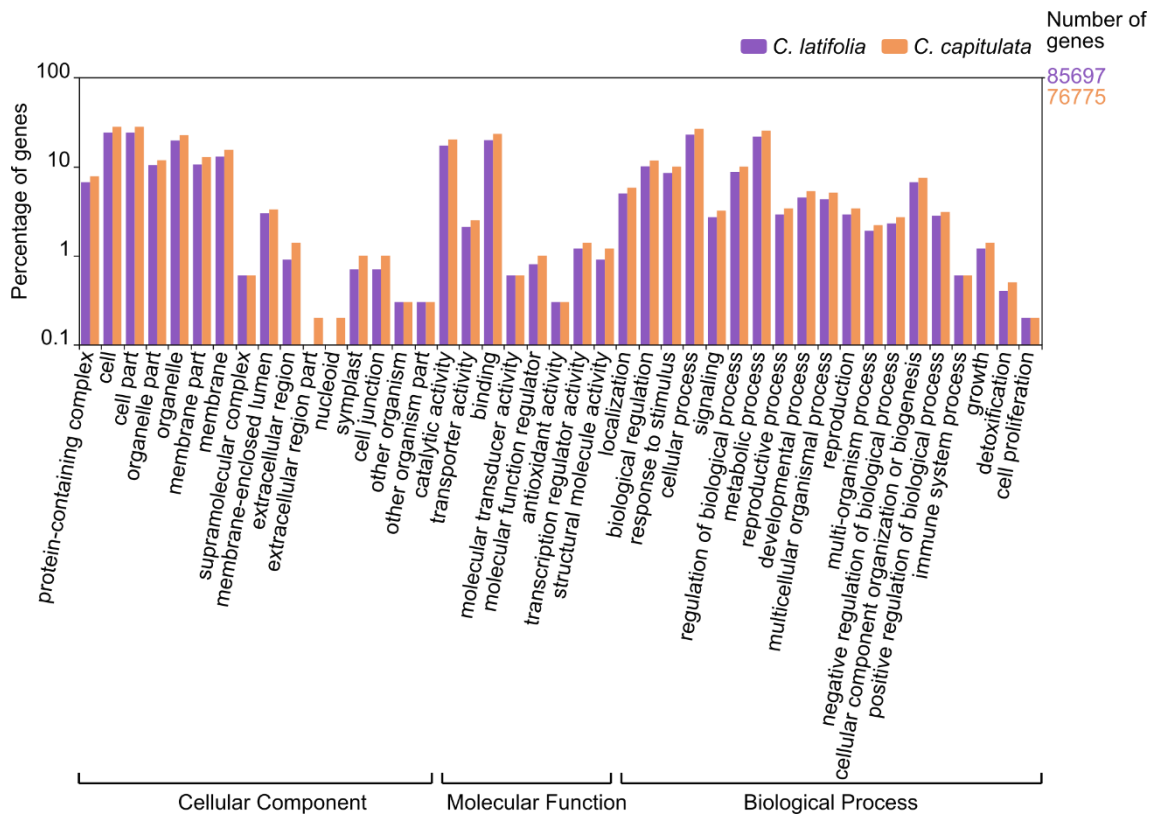


図 4-3 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* 果実の転写物の Gene Ontology (GO) アノテーション

クルクリゴの 28,100、オオキンバイザサの 29,614 転写物を GO タームによって分類した。

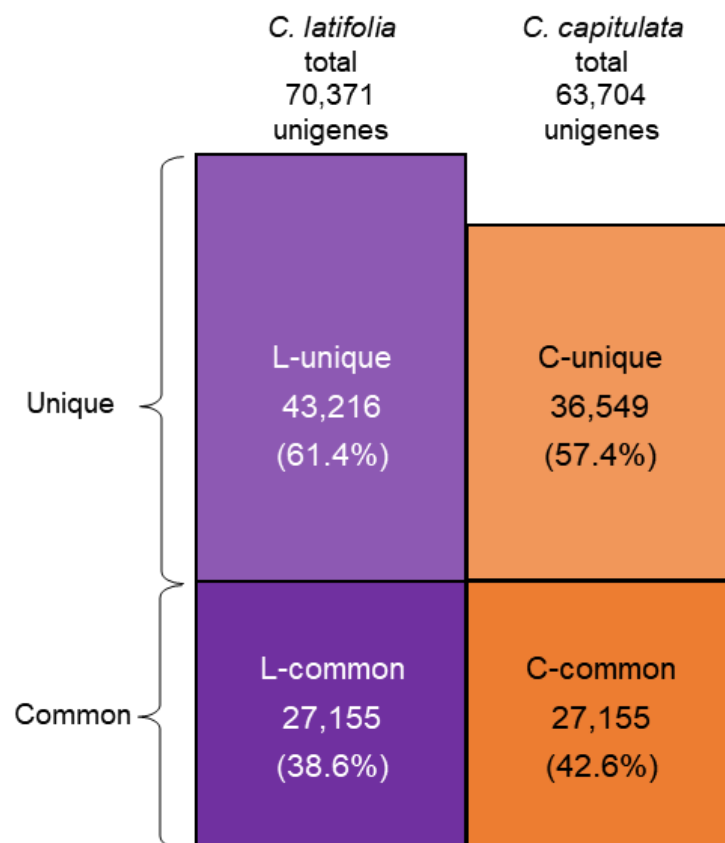


図 4-4 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* 果実の相同性の高い遺伝子
 クルクリゴを紫色、オオキンバイザサを橙色で示した。相同性の高い遺伝子を common（クルクリゴは L-common、オオキンバイザサは C-common）、相同性の低い遺伝子を unique（クルクリゴは L-unique、オオキンバイザサは C-unique）と定義した。

表 4-3 クルクリゴとオオキンバイザサの unigene でアノテーションされた転写物数

Annotated database	クルクリゴ		オオキンバイザサ	
	L-common	L-unique	C-common	C-unique
COG	6,279	2,493	6,211	3,355
RefSeq	17,194	11,452	17,065	13,889
Uniprot	16,899	10,855	16,764	13,919
NR	17,021	11,015	16,896	14,181
Rice	16,298	9,885	16,150	12,199
Arabidopsis	15,895	9,135	15,754	11,421
All six databases	17,337	11,718	17,199	14,848

各データベースは表 4-2 と同様である。

表 4-4 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の発現量プロファイルの比較

<i>C. latifolia</i>			<i>C. capitulata</i>			Pident [†]	E-value [†]
Transcript ID	RefSeq	TPM	Transcript ID	RefSeq	TPM		
L_19492_c6_g1_i1	trans-resveratrol di-O-methyltransferase	36282	C_19332_c0_g2_i1	trans-resveratrol di-O-methyltransferase	277	99.18	0
L_20774_c6_g2_i5	trans-resveratrol di-O-methyltransferase	31648	C_20405_c1_g1_i2	trans-resveratrol di-O-methyltransferase	573	99.02	0
*L_22219_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	7634	*C_16562_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	80	97.75	0
L_22040_c0_g1_i1	chalcone synthase-like	6483	C_22230_c0_g1_i1	chalcone synthase-like	69	100	0
L_39489_c0_g1_i1	cinnamoyl-CoA reductase 1-like	4584	C_43958_c0_g1_i1	cinnamoyl-CoA reductase 1-like	37	100	0
L_17418_c0_g1_i1	benzyl alcohol O-benzoyltransferase	2848	C_20771_c2_g1_i3	benzyl alcohol O-benzoyltransferase	18	96.27	0
L_18625_c0_g1_i1	glutelin type-A 1-like	2641	C_18515_c0_g1_i1	glutelin type-A 1-like	35	100	0
L_20161_c0_g1_i1	probable polyamine oxidase 5	2333	C_20921_c0_g1_i1	probable polyamine oxidase 5	38	99.17	0
L_20171_c0_g1_i1	pyruvate decarboxylase 1 isoform X1	2140	C_19622_c0_g1_i1	pyruvate decarboxylase 1 isoform X1	30	99.74	0
L_19390_c0_g1_i1	benzyl alcohol O-benzoyltransferase-like	1721	C_20336_c0_g1_i1	benzyl alcohol O-benzoyltransferase-like	25	99.01	0
L_17288_c0_g1_i1	5-methyltetrahydropteroyl-triglutamate--homocysteine methyltransferase 1	1527	C_20491_c0_g1_i4	5-methyltetrahydropteroyl-triglutamate--homocysteine methyltransferase 2-like	19	98.22	0
L_22101_c0_g1_i1	cytochrome P450 71A1-like	1130	C_20591_c0_g1_i1	cytochrome P450 71A1-like	14	100	0
L_9054_c0_g2_i1	uncharacterized protein LOC105052971	891	C_20462_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105052971	16	99.15	0
L_19899_c1_g1_i5	elongation factor 1-alpha-like	720	C_16211_c0_g1_i1	hypothetical protein CARUB_v100096370mg, partial	11	99.75	0
L_39417_c0_g1_i1	palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase, chloroplastic-like	659	C_1125_c0_g1_i1	palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase, chloroplastic-like	0.89	99.88	0
L_8999_c0_g1_i1	probable protein Pop3	657	C_3239_c0_g1_i1	probable protein Pop3	10	99.79	0
*L_16562_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	652	*C_16324_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	8	98.8	0
L_20784_c0_g1_i1	mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5-like	477	C_20300_c0_g1_i1	mannan endo-1,4-beta-mannosidase 5-like	8	99.81	0
L_17063_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC103705182	457	C_15604_c0_g1_i1		7	99.51	0
L_9763_c0_g1_i1	4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase	441	C_17419_c0_g1_i2	4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase	6	97.85	0
L_15645_c0_g1_i1	hypothetical protein PHAVU_005G042200g	378	C_19503_c0_g1_i2	uncharacterized protein LOC103713005	4	98.6	0
L_39500_c0_g1_i1	uncharacterized protein C24B11.05-like isoform X2	323	C_15665_c0_g1_i2	uncharacterized protein C24B11.05-like isoform X2	6	96.74	0
L_16206_c0_g1_i1	cytochrome P450 71A1-like	295	C_18399_c0_g1_i1	cytochrome P450 71A1-like	5	99.88	0
L_9770_c0_g1_i1	Os09g0480700, partial	278	C_11365_c0_g1_i1	Os09g0480700, partial	3	99.52	0
L_20943_c2_g1_i1	LOW QUALITY PROTEIN: ATP-citrate synthase beta chain protein 1-like	276	C_20189_c1_g1_i6	LOW QUALITY PROTEIN: ATP-citrate synthase beta chain protein 1-like	5	99.74	0
L_5031_c0_g1_i1		265	C_26197_c0_g1_i1		3	99.53	2E-108
L_19581_c0_g1_i1	peroxidase 43	244	C_20763_c0_g1_i7	peroxidase 43	3	99.32	0
L_22200_c0_g1_i1		237	C_21279_c0_g3_i1		0	92.42	0
L_16082_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105035694	230	C_20815_c0_g1_i2	uncharacterized protein LOC105035694	4	97.73	0

表 4-4 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の発現量プロファイルの比較 (続)

<i>C. latifolia</i>			<i>C. capitulata</i>			Pident [†]	E-value [†]
Transcript ID	RefSeq	TPM	Transcript ID	RefSeq	TPM		
L_1821_c0_g1_i1	protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like	213	C_5863_c0_g3_i1	protein EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15-like	1	94.17	0
L_21840_c4_g7_i1		197	C_46444_c0_g1_i1		2	100	0
L_11489_c0_g1_i1		189	C_51079_c0_g1_i1		3	95.13	4E-114
L_21813_c0_g1_i1	protein kinase APK1B, chloroplastic-like	184	C_20869_c0_g1_i9	protein kinase APK1B, chloroplastic-like	0.97	95.04	0
L_16611_c0_g1_i1		163	C_8161_c0_g1_i1		2	100	0
L_12355_c0_g1_i1	myb-related protein 306-like	160	C_7266_c0_g1_i1	myb-related protein 306-like	3	99.89	0
L_18378_c0_g1_i1	probable L-ascorbate peroxidase 4	158	C_17994_c1_2_i1	probable L-ascorbate peroxidase 4	2	96.39	0
L_21677_c0_g1_i1	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	149	C_15562_c0_g2_i1	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme-like	0.92	96.67	0
L_14830_c0_g1_i1	NAC transcription factor 29-like	135	C_20428_c0_g1_i1	NAC transcription factor 29-like	0	97.61	0
L_14165_c0_g2_i1	probable peroxygenase 4	131	C_17339_c0_g1_i2	probable peroxygenase 4	2	95.32	0
L_21840_c4_g4_i2		130	C_11729_c0_g1_i1		2	100	0
L_39737_c0_g1_i1	Glutathione peroxidase 2	127	C_8347_c0_g1_i1	Glutathione peroxidase 2	2	96.26	0
L_4928_c0_g1_i1		124	C_44794_c0_g1_i1		1	100	3E-101
L_20250_c0_g1_i1	protein NRT1/ PTR FAMILY 5.6-like	114	C_29979_c0_g1_i1	protein NRT1/ PTR FAMILY 5.6-like	2	97.44	0
L_15628_c0_g1_i1	formin-A-like	103	C_20575_c0_g1_i5	formin-A-like	0	90.44	0
L_21235_c2_g9_i1		101	C_9877_c0_g1_i1		1	92.77	3E-98
*L_19752_c0_g1_i1	mannose-specific lectin 3-like	33	*C_18595_c0_g1_i1	mannose-specific lectin 3-like	2301	97.6	0
L_16463_c0_g2_i2	LOW QUALITY PROTEIN: S-norcochlorine synthase-like	16	C_6989_c0_g1_i1	LOW QUALITY PROTEIN: S-norcochlorine synthase-like	8393	91.39	0
L_32395_c0_g1_i1		14	C_4973_c0_g1_i1		8765	86.17	4E-92
L_19456_c0_g1_i1	polyphenol oxidase, chloroplastic-like	13	C_20237_c3_g1_i1	polyphenol oxidase, chloroplastic-like	1496	83.82	0
L_14333_c0_g1_i1		12	C_13197_c0_g1_i1		42047	94.54	7E-75
L_55067_c0_g1_i1	defensin Ec-AMP-D1 {ECO:0000303 PubMed:18625284}-like	9	C_39416_c0_g1_i1	defensin Ec-AMP-D1 {ECO:0000303 PubMed:18625284}-like	2475	95.1	0
L_5253_c0_g1_i1	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein, putative	9	C_16870_c0_g2_i1	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein, putative	547	94.54	0
L_1586_c0_g1_i1	glycine-rich protein-like isoform X1	8	C_39384_c0_g1_i1		2895	94.72	0
L_23556_c0_g1_i1	basic blue protein-like	5	C_14117_c0_g1_i1	basic blue protein-like	606	94.75	0
L_13618_c0_g1_i1	non-specific lipid-transfer protein 1-like	5	C_13976_c0_g1_i1	lipid transfer protein precursor	655	96.6	0
L_465_c0_g2_i1	microsomal glutathione S-transferase 3-like	5	C_4959_c0_g1_i1	microsomal glutathione S-transferase 3-like	246	93.89	0
L_21384_c3_g4_i1		5	C_17484_c0_g1_i1		424	86.76	1E-56
L_9003_c0_g1_i1	dirigent protein 22-like isoform X1	5	C_19511_c0_g1_i1	dirigent protein 22-like	834	96.09	0
L_4015_c0_g1_i1	CASP-like protein 2A1	4	C_4840_c0_g1_i1	CASP-like protein 2A1	241	98.25	0

表 4-4 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の発現量プロファイルの比較 (続)

<i>C. latifolia</i>			<i>C. capitulata</i>			Pident [†]	E-value [†]
Transcript ID	RefSeq	TPM	Transcript ID	RefSeq	TPM		
L_16618_c0_g1_i1	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g026700	3	C_4999_c0_g1_i1	Bowman-Birk type trypsin inhibitor-like isoform X2	5459	86.06	1E-135
L_4834_c0_g2_i1	xylem serine proteinase 1-like	3	C_9966_c0_g1_i1	subtilisin-like protease	232	96.91	0
L_6907_c0_g1_i1	serine/threonine-protein kinase CDL1-like	3	C_11871_c1_g1_i1	serine/threonine-protein kinase CDL1-like	183	96.44	0
L_17444_c0_g1_i1	cytochrome P450 CYP82D47-like	3	C_20684_c0_g1_i1	cytochrome P450 CYP82D47-like	182	94.92	0
L_40485_c0_g3_i1	non-specific lipid-transfer protein 1-like	3	C_39065_c0_g1_i1	non-specific lipid-transfer protein 1-like	1455	90.92	0
L_18380_c0_g1_i2	conserved hypothetical protein	3	C_39186_c0_g1_i1	conserved hypothetical protein	654	93.2	4E-127
L_31252_c0_g1_i1		3	C_12650_c0_g1_i1	non-specific lipid-transfer protein-like	283	94.9	4E-65
L_42464_c0_g2_i1	alpha carbonic anhydrase 8-like, partial	3	C_40148_c0_g1_i1	alpha carbonic anhydrase 7-like	235	93.1	0
L_13852_c0_g1_i1	endoglucanase 6	3	C_18579_c0_g1_i1	endoglucanase 19-like	707	97.65	0
L_39898_c0_g1_i1	oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic-like	2	C_12932_c0_g1_i1	oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic-like	160	96.93	0
L_6056_c0_g1_i1	Calvin cycle protein CP12-1, chloroplastic-like	2	C_12691_c0_g1_i1	calvin cycle protein CP12-1, chloroplastic	215	92.42	3E-128
L_6093_c0_g1_i1		2	C_41578_c0_g1_i1		170	93.87	2E-135
L_17773_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056845	2	C_12165_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056845	249	92.36	0
L_24151_c0_g1_i1	ribonuclease 3-like	2	C_39292_c0_g1_i1	ribonuclease 3-like	389	98.07	0
L_8678_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056672	2	C_4730_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056672	116	98.71	0
L_19431_c2_g4_i1	polyubiquitin 4-like, partial	2	C_20039_c0_g8_i1	hypothetical protein PHAVU_003G1236000g, partial	2116	94.38	6E-106
L_250_c1_g1_i1	probable glutathione S-transferase parA	2	C_16559_c0_g1_i1	probable glutathione S-transferase parA	419	98.26	0
L_10676_c0_g1_i1	probable linoleate 9S-lipoxygenase 5	2	C_17658_c0_g1_i1	probable linoleate 9S-lipoxygenase 5	1644	98.82	0
L_8975_c0_g1_i1	chitinase-like protein 1	2	C_16475_c1_g1_i1	chitinase-like protein 1	183	97.92	0
L_44393_c0_g1_i1	hypothetical protein POPTR_0004s03650g	2	C_18495_c2_g1_i1	conserved hypothetical protein	2751	92.78	3E-66
L_759_c0_g1_i1	CAS1 domain-containing protein 1-like	2	C_21365_c0_g1_i1	CAS1 domain-containing protein 1-like isoform X2	183	99.26	0
L_30327_c0_g1_i1	conserved hypothetical protein	2	C_23037_c0_g1_i1	conserved hypothetical protein	134	96.47	2E-116
L_5572_c0_g1_i1	short-chain type dehydrogenase/reductase-like	2	C_14194_c0_g1_i1	short-chain type dehydrogenase/reductase-like	205	96.22	0
L_45139_c0_g1_i1	putative germin-like protein 2-1	2	C_21890_c0_g1_i1	putative germin-like protein 2-1	111	96.2	1E-146
L_22251_c0_g1_i1	xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase protein 9-like	2	C_40495_c0_g2_i1	LOW QUALITY PROTEIN: xyloglucan endotransglucosylase/ hydrolase protein 9-like	131	98.37	0
L_56341_c0_g1_i1	peroxidase 4-like	1	C_10149_c0_g1_i1	peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A-like	1301	93.81	2E-93
L_56680_c0_g1_i1	peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase A-like	1	C_19920_c0_g1_i1	peroxidase 4-like	583	98.68	7E-113
*L_307_c0_g2_i1	mannose-specific lectin-like	1	*C_9931_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	14867	99.35	0

表 4-4 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* の発現量プロファイルの比較 (続)

<i>C. latifolia</i>			<i>C. capitulata</i>			Pident [†]	E-value [†]
Transcript ID	RefSeq	TPM	Transcript ID	RefSeq	TPM		
L_48085_c0_g1_i1	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1	1	C_19080_c1_g1_i1	probable indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1	107	84.39	2E-70
L_46946_c0_g1_i1	chlorophyll a-b binding protein 7, chloroplastic-like	1	C_41884_c0_g1_i1	chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	141	98.41	0
L_4845_c0_g1_i1	chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic-like	1	C_10575_c0_g1_i1	chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic-like	353	98.25	0
L_23363_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056050	1	C_21609_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056050	1612	98.84	0
*L_30823_c0_g1_i1	mannose-specific lectin-like	1	*C_17363_c2_g1_i3	mannose-specific lectin-like	317	98.64	0
L_645_c0_g1_i1	putative lipid-transfer protein DIR1	1	C_12082_c0_g1_i1	putative lipid-transfer protein DIR1	108	97.09	0
L_50661_c0_g1_i1	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic-like	1	C_14711_c0_g1_i1	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplastic-like	133	97.74	0
L_16663_c0_g1_i2		1	C_20564_c0_g1_i1		642	89.54	2E-112
L_41624_c0_g1_i1	isocitrate lyase	1	C_15046_c0_g1_i1	isocitrate lyase	116	98.32	7E-180
L_33923_c0_g1_i1	galactinol synthase 2-like isoform X1	1	C_13705_c0_g1_i1	galactinol synthase 1-like	127	92.82	0
L_36400_c0_g1_i1	putative cell wall protein	0.98	C_26021_c0_g1_i1	putative cell wall protein	117	98.05	2E-98
L_53880_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105056050	0.93	C_5177_c0_g1_i1	proactivator polypeptide-like 1	644	98.94	0
L_6399_c0_g1_i1	auxin-induced protein 22D-like	0.93	C_10469_c0_g1_i1	auxin-induced protein 22D-like	171	96.71	0
L_10569_c0_g2_i1		0.91	C_16356_c0_g1_i1		1072	93.62	0
L_21646_c1_g1_i3	protein HOTHEAD-like	0.91	C_14207_c0_g1_i1	protein HOTHEAD-like	330	96.12	0
L_22097_c0_g1_i1		0.82	C_9693_c0_g2_i1		155	92.67	0
L_30250_c0_g1_i1	polygalacturonase inhibitor	0.64	C_17486_c1_g1_i2	Polygalacturonase inhibitor	171	93.72	2E-170
L_50985_c0_g1_i1	putative phyto-sulfokines 6 isoform X1	0.47	C_22933_c0_g1_i1	putative phyto-sulfokines 6 isoform X2	136	95.71	0
L_39567_c0_g2_i1	profilin-1	0	C_15886_c0_g1_i1	profilin-1	615	97.97	0
L_5103_c0_g1_i1	trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like	0	C_39904_c0_g1_i1	trans-resveratrol di-O-methyltransferase-like	430	79.15	0
L_24431_c0_g6_i1	60S ribosomal protein L24	0	C_1942_c0_g1_i1	60S ribosomal protein L24	278	97.76	0
L_3220_c0_g1_i1		0	C_1273_c0_g1_i1	chlorophyll a-b binding protein 6, chloroplastic	264	92.97	3E-47
L_16735_c0_g2_i2	uncharacterized protein LOC105047938	0	C_39063_c0_g1_i1	uncharacterized protein LOC105047938	172	92.49	0
L_256_c0_g1_i2	Os06g0133500	0	C_16734_c1_g2_i1	Os06g0133500	151	92.07	9E-165

*: ネオクリン類似転写物を、網掛けで示した。(cf. 図 4-5)

†: Pident と E-value は、クルクリゴをクエリーとしてオオキンバイザサに対する BLASTN 検索を実行し得られた。2 種の TPM 値が 50 以上の Common gene を選択し、クルクリゴの TPM 値でソートした。

表 4-5 クルクリゴとオオキンバイザサ果実で tBLASTN により推定されたレクチン遺伝子の数

Lectin domain	Model lectin	クルクリゴ	オオキンバイザサ
ABA domain	<i>Agaricus bisporus</i> agglutinin	0	0
Amaranthin domain	<i>Amaranthus caudatus</i> agglutinin	0	0
CRA domain	<i>Robinia pseudoacacia</i> chitinase-related agglutinin	3	4
Cyanovirin domain	<i>Nostoc ellipsosporum</i> agglutinin	0	0
EUL domain	<i>Euonymus europaeus</i> agglutinin	1	1
GNA domain	<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	10	13
Hevein domain	<i>Hevea brasiliensis</i> agglutinin	3	2
JRL domain	<i>Artocarpus integer</i> agglutinin	9	4
Legume domain	<i>Glycine max</i> agglutinin	8	16
LysM domain	<i>Brassica juncea</i> LysM domain	1	1
Nictaba domain	<i>Nicotiana tabacum</i> agglutinin	10	8
Ricin-B domain	<i>Ricinus communis</i> agglutinin	0	0
Total number of <i>lectin</i> genes		45	49

ネオクリンに類似する GNA ドメインを網掛けした。

表 4-6 クルクリゴとオオキンバイザサ果実の系統解析を行う上で実行した BLAST 検索結果

	query					図 4-5
	GNA-AA	NBS-nucl	NBS-AA	NAS-nucl	NAS-AA	
<i>C. latifolia</i>						
L_10120_c0_g1_i1		✓				
L_16562_c0_g1_i1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L_16562_c0_g1_i2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L_17248_c0_g1_i1		✓				
L_17248_c0_g2_i1		✓				
L_19141_c0_g1_i1		✓				
L_19141_c0_g1_i2		✓				
L_19141_c0_g1_i3		✓				
L_19141_c0_g1_i4		✓				
L_19752_c0_g1_i1	✓		✓	✓	✓	✓
L_22219_c0_g1_i1	✓		✓	✓	✓	✓
L_307_c0_g1_i1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L_307_c0_g2_i1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L_30823_c0_g1_i1	✓		✓	✓	✓	✓
L_3227_c0_g1_i1		✓				
L_4561_c0_g1_i1		✓				
L_4561_c1_g1_i1		✓				
L_52738_c0_g1_i1	✓		✓	✓	✓	✓
L_9832_c0_g1_i1	✓		✓	✓	✓	✓
L_9832_c0_g2_i1	✓		✓	✓	✓	✓
<i>C. capitulata</i>						
C_16324_c0_g1_i1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C_16324_c0_g1_i2	✓	✓	✓	✓	✓	✓
C_16562_c0_g1_i1	✓		✓		✓	✓
C_16562_c0_g1_i2	✓		✓		✓	✓
C_17363_c2_g1_i1	✓		✓		✓	✓
C_17363_c2_g1_i2	✓		✓		✓	✓
C_17363_c2_g1_i3	✓		✓		✓	✓
C_17363_c2_g1_i4	✓		✓		✓	✓
C_18595_c0_g1_i1	✓		✓		✓	✓
C_20510_c1_g2_i1			✓			✓
C_20538_c0_g1_i1		✓				
C_37873_c0_g1_i1			✓		✓	✓
C_48713_c0_g1_i1	✓		✓		✓	✓
C_9108_c0_g1_i1	✓					✓
C_9454_c0_g1_i1	✓		✓		✓	✓
C_9931_c0_g1_i1	✓	✓	✓	✓	✓	✓

GNA (UniProtKB/Swiss-Prot: P30617.1) のアミノ酸配列 (AA) および NBS (GenBank: X64110.1, GenBank: CAA45476.1) と NAS (GenBank: AB167079.1, GenBank: BAD29946.1) の AA と核酸配列 (nucl) をクエリーとして BLAST 検索を実行して得られた配列を示した。これら、および図 4-5 で示した系統解析に使用した配列にチェックマーク (✓) を施した。

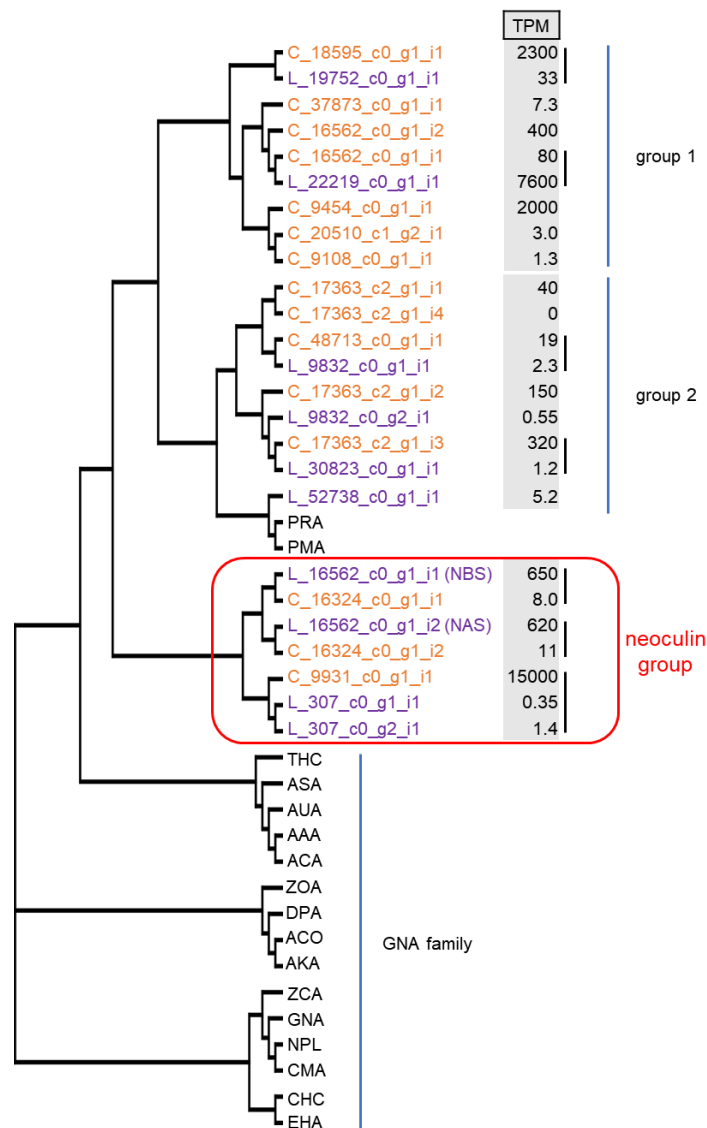


図4-5 ネオクリン類似転写物の系統図と発現量

ネオクリン類似転写物とGNAファミリーはCulstalXを用いてアライメントした。系統樹は近隣結合法(ブートストラップ値=1000)で構築した。De novoトランスクリプトーム解析のIDはクルクリゴを紫色、オオキンバイザサを橙色で示した。クルクリゴのL_16562_c0_g1_i1 と L_16562_c0_g1_i2 はNBSとNASに相当した (図4-10参照)。Transcript per million (TPM) 値はトランスクリプトIDの右に示した。NBS、NASと高い相同性のあるトランスクリプトはネオクリングループneoculin group (赤枠で示す)と名付けた。他の高い相同性が推定されるタンパク質はグループ1 group1、グループ2 group2とした。TPM値の右の縦線はクルクリゴとオオキンバイザサのペアを示す。GNAファミリーの植物種と配列は以下の通り。Protein Data Bankの構造名を括弧で示す。ASA: *Allium sativum* (1BWU)、GNA: *Galanthus nivalis* (1MSA)、NPL: *Narcissus pseudonarcissus* (1NPL)。他の配列はGenBankから得た。PRA: *Polygonatum roseum* (AY899824)、PMA: *Polygonatum multiflorum* (U44775)、CMA: *Clivia miniata* (L16512)、ZCA: *Zephyranthes candida* (AF527385)、AAA: *Allium ascalonicum* (L12172)、ACA: *Allium cepa* (AY376826)、AUA: *Allium ursinum* (U68531)、THC: *Tulipa hybrid cultivar* (U23043)、ZOA: *Zingiber officinale* (AY657021)、ACO: *Ananas comosus* (AY098512)、AKA: *Amorphophallus konjac* (AY191004)、DPA: *Dioscorea polystachya* (AB178475)、CHC: *Cymbidium hybrid cultivar* (U02516)、EHA: *Epipactis helleborine* (U02515)。

		1	
NBS		M A A K F L L T I L V T F A A V A S L G M A D N V L L S G Q	
L_16562_c0_g1_i1		M A A K F L L T I L V T F A A V A S L G M A D N V L L S G Q	
NAS		M A A K F L L T I L V T F A A V A S L G M A D S V L L S G Q	
L_16562_c0_g1_i2		M A A K F L L T I L V T F A A V A S L G M A D N V L L S G Q	
	10	20	30
NBS			
L_16562_c0_g1_i1	T L H A D H S L Q A G A Y T L T I Q N K C N L V K Y Q N G R		
NAS	T L Y A G H S L T S G S Y T L T I Q N N C N L V K Y Q H G R		
L_16562_c0_g1_i2	T L Y A G H S L T S G S Y T L T I Q N N C N L V K Y Q H G R		
	40	50	60
NBS			
L_16562_c0_g1_i1	Q I W A S N T D R R G S G C R L T L L S D G N L V I Y D H N		
NAS	Q I W A S D T D G Q G S Q C R L T L R S D G N L I I Y D D N		
L_16562_c0_g1_i2	Q I W A S D T D G Q G S Q C R L T L R S D G N L I I Y D D N		
	70	80	90
NBS			
L_16562_c0_g1_i1	N N D V W G S A C W G D N G K Y A L V L Q K D G R F V I Y G		
NAS	N N D V W G S A C W G D N G K Y A L V L Q K D G R F V I Y G		
L_16562_c0_g1_i2	N M V V W G S D C W G N N G T Y A L V L Q Q D G L F V I Y G		
	100	110	114
NBS			
L_16562_c0_g1_i1	P V L W S L G P N G C R R V N G G I T V A K D S T E P Q H E		
NAS	P V L W P L G L N G C R S L N G E I T V A K D S T E P Q H E		
L_16562_c0_g1_i2	P V L W P L G L N G C R S L N G E I T V A K D S T E P Q H E		
NBS	D I K M V I N N		
L_16562_c0_g1_i1	D I K M V I N N		
NAS	D I K M V I N N		
L_16562_c0_g1_i2	D I K M V I N N		

図4-7 公開データベースのネオクリン(NBS、NAS)のアミノ酸配列と本実験で同定されたクルクリゴのタンパク質の比較

NBSとNASで異なるアミノ酸残基のうち、NBSに対しては青色、NASに対しては赤色で示した。

L_16562_c0_g1_i2のAsn-2は、NASではセリンであるところが唯一異なる。

表 4-7 クルクリゴ *C. latifolia* およびオオキンバイザサ *C. capitulata* のネオクリンに関する遺伝子の qRT-PCR 解析

(A) ネオクリンに関する 6 遺伝子およびユビキチン遺伝子 (L_19431_c0_g1_i2、C_20039_c0_g6_i1) のプライマー配列。

(B) qRT-PCR で得られた相対遺伝子量。数値は各 3 果実からの測定値を平均し、各々の種のユビキチン遺伝子で標準化した。

(A)

Species	Transcript ID	Primer Name	Direction	Sequence (5'-3')	Size of amplification (bp)
<i>C. latifolia</i>	L_16562_c0_g1_i1	NBS-fw1	forward	ACGACCACAACAACAACGAC	104
		NBS-rv1	reverse	CGGGCCATAGATGACAAATCTG	
<i>C. latifolia</i>	L_16562_c0_g1_i2	NAS-fw1	forward	ACGACGACAACAACATGGTC	103
		NAS-rv1	reverse	GGGCCATAGATGACAAAGAGG	
<i>C. latifolia</i>	L_307_c0_g1_i1 / L_307_c0_g2_i1	L_307-fw1	forward	GGCAACAACAACAATGCCG	101
		L_307-rv1	reverse	GGCCCATAGATGACCACATTG	
<i>C. capitulata</i>	C_16324_c0_g1_i1 (Comp.)	NBS-fw1	forward	ACGACCACAACAACAACGAC	104
		NBS-rv1	reverse	CGGGCCATAGATGACAAATCTG	
<i>C. capitulata</i>	C_16324_c0_g1_i2 (Comp.)	NAS-fw1	forward	ACGACGACAACAACATGGTC	103
		NAS-rv1	reverse	GGGCCATAGATGACAAAGAGG	
<i>C. capitulata</i>	C_9931_c0_g1_i1	C_9931-fw1	forward	ACGGCAACAACAACAATGC	103
		C_9931-rv1	reverse	GGCCCATAGATGACCACATTG	
<i>C. latifolia</i>	L_19431_c0_g1_i2	ubiquitin-fw1	forward	TATAATCTGCAAGGGTCCGGC	93
		ubiquitin-rv1	reverse	AGATTCAGGACAAGGAGGGG	
<i>C. capitulata</i>	C_20039_c0_g6_i1	ubiquitin-fw1	forward	TATAATCTGCAAGGGTCCGGC	93
		ubiquitin-rv1	reverse	AGATTCAGGACAAGGAGGGG	

(B)

Species	Transcript ID	Relative Quantification	
		Average	SE
<i>C. latifolia</i>	L_16562_c0_g1_i1	1.49	0.24
<i>C. latifolia</i>	L_16562_c0_g1_i2	1.24	0.15
<i>C. latifolia</i>	L_307_c0_g1_i1/L_307_c0_g2_i1	0.98	0.34
<i>C. capitulata</i>	C_16324_c0_g1_i1 (Comp.)	0.00040	0.00029
<i>C. capitulata</i>	C_16324_c0_g1_i2 (Comp.)	0.00038	0.00027
<i>C. capitulata</i>	C_9931_c0_g1_i1	15.01	3.13

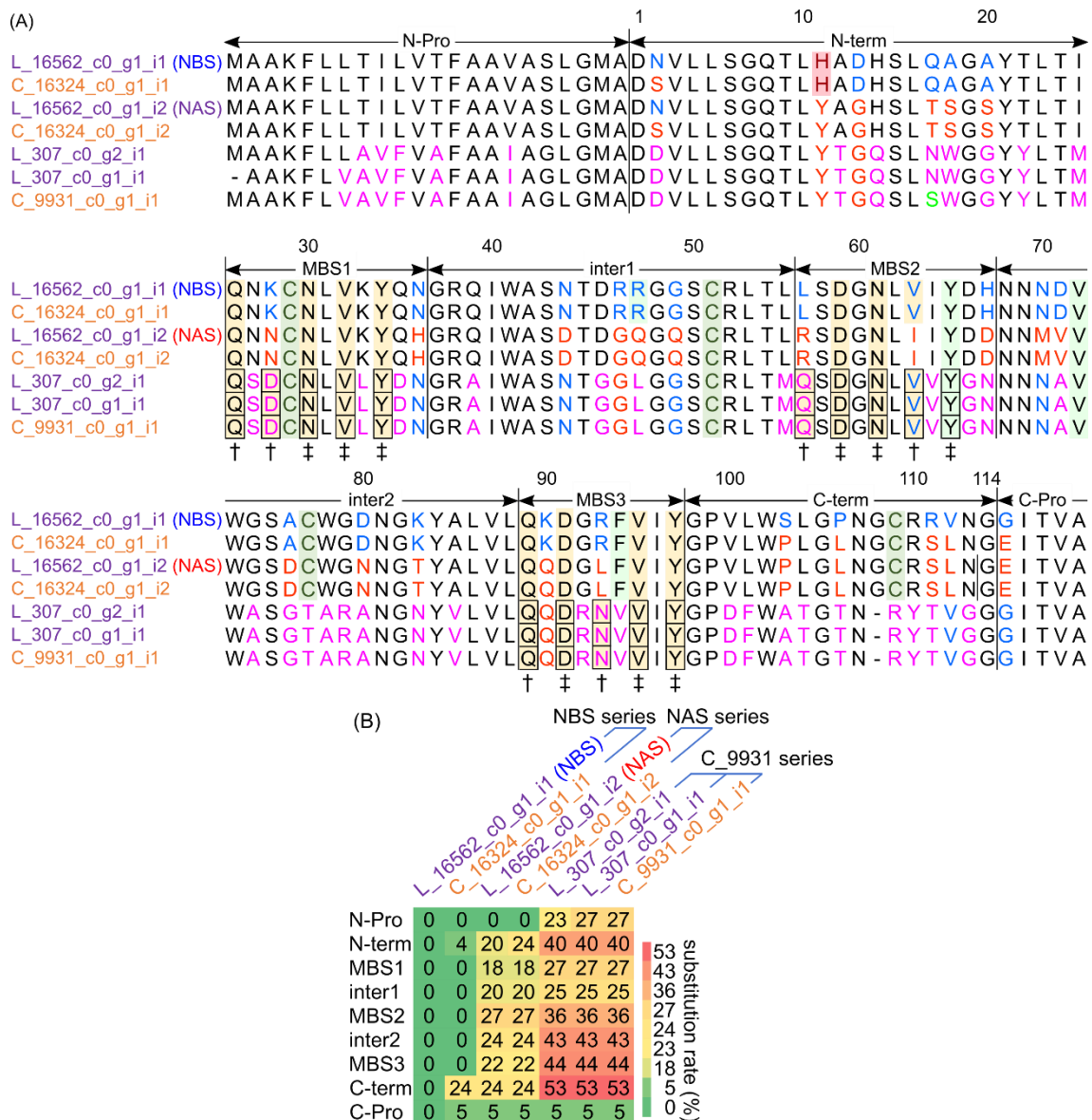


図 4-8 ネオクリングループのアミノ酸配列とその置換率

(A) クルクリゴとオオキンバイザサ果実のネオクリングループのアミノ酸配列アライメント。NBS のみ、または NAS のみのアミノ酸残基はそれぞれ青色と赤色で示した。NBS と NAS のどちらとも異なる残基は桃色で示した。C_9931_c0_g1_i1 にのみ見られる残基(Ser17)は明緑色で示した。His-11 と Cys はそれぞれ濃赤色と濃緑色で網掛けした。Arg-48、Tyr-65、Val-72、Phe-94 は淡緑色で網掛けした。マンノース結合サイト(MBS、QxDxNxVxY)はダガー(†)で示し、保存された残基は黄色で網掛けした。全ての配列で保存されている MBS 残基はダブルダガー(‡)で示した。L_307_c0_g2_i1、L_307_c0_g1_i1 と C_9931_c0_g1_i1 の MBS 残基は箱で囲った。推定タンパク質は N、C 末端と 3 つの MBS 領域、MBS の間の領域の 9 つの領域に分割した。すなわち N-Pro、Nterm、MBS1、inter1、MBS2、inter2、MBS3、C-term、C-Pro。

(B) ネオクリングループのタンパク質におけるアミノ酸置換。ヒートマップに示された値はネオクリングループの NBS 配列を基準にした置換率(%)を示す。

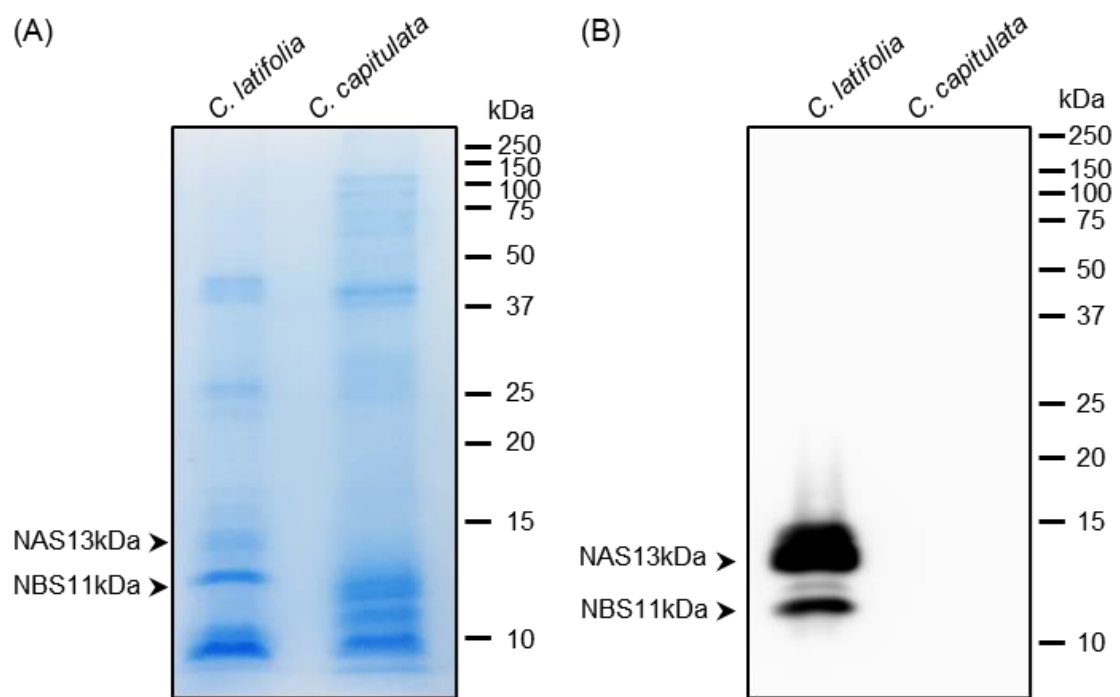


図 4-10 クルクリゴ *C. latifolia* とオオキンバイザサ *C. capitulata* 果実の生化学的解析

クルクリゴとオオキンバイザサの各々1個の果実の抽出物を SDS-PAGE に使用した。各果実の 20 μ g のタンパク質をウェルにアプライした。

(A) CBB 染色、(B) 抗 NAS 抗体・抗 NBS 抗体を用いたウェスタンブロットティング

考察

本研究ではクルクリゴとオオキンバイザサの果実で発現する mRNA を網羅的に把握する目的で、NGS を用いたシーケンス解析を実施した。その結果、ネオクリンに類似したアミノ酸配列を、クルクリゴからは 10、オオキンバイザサからは 15 を見いだした (表 4-6 および図 4-5)。これらのアミノ酸配列についてアライメントを作成してみると、両植物種がネオクリンやレクチン活性を有すると推定されるネオクリン類似配列を共通して保有することが示された (図 4-6)。しかし、それぞれの発現レベルに着目して比較してみると、クルクリゴで大量に発現する配列のオーソログはオオキンバイザサではわずかしか発現せず、逆にオオキンバイザサで大額に発現する配列のオーソログはクルクリゴではわずかな発現量であった (図 4-5)。このことは両種が進化する過程で、遺伝子重複が生じたことを強く示唆するものである。

クルクリゴおよびキンバイザサの NGS で得られたリードをアセンブルするために、非モデル植物で汎用されていると考えられる Trinity を使用した。非モデル植物では特にアセンブルデータの正確性は懸念されるところで、パラメータの設定や他のアセンブルプログラムとの比較などに多数の検証が行われ、Trinity だけでは不十分な点も指摘されている (Haas et al., 2019; Holding et al., 2018; Madritsch et al., 2021)。本研究では、ネオクリンに類似の遺伝子に特に注目し、また計算リソースの兼ね合いからデフォルトのパラメータで計算を行った。

クルクリゴおよびオオキンバイザサの果実で発現する遺伝子数は、CD-Hit のクラスタリングによって、クルクリゴで 70,371、オオキンバイザサで 63,704 と見積もることができた。一方で例えば配列比較に用いたイネゲノムの遺伝子数は約 38,000、シロイヌナズナゲノムは約 29,000 である (International Rice Genome Sequencing Project, 2005)。これらと比べるとクルクリゴとオオキンバイザサは 2 倍体でありながら (Eksomtramage et al., 2013)、非常に多く見積もられた。しかし、ピタヤ (*Hylocereus polyrhizus*) の蕾のトランスクリプトーム解析では、Illumina HiSeq4000 プラットフォームで得られたリードを Trinity でアセンブルする類似の方法で 68,113 の unigene が得られた (Xiong et al., 2020)。同様に NGS で得られたリードを Trinity でアセンブルした他の RNA-seq の論文ではコショウ (*Piper nigrum*) で 40,537 (Hu et al., 2015)、ラズベリー (*Rubus idaeus*) で 68,853 (González et al., 2020) の unigene が得られた。先にも述べたように Trinity だけ、また計算パラメータの追い込みがない状態の RNA-seq では実際より多数の遺伝子が検出されると考えられる。Trinity をはじめとする de Bruijn グラフを用いたアセンブリプログラムでは、キメラ転写産物を回収してしまうこともある (Holding et al., 2018)。また研究時点では SNP (single nucleotide polymorphism) について考慮しなかったが、RNA-seq のデータから SNP を見つける方法も考案されている (Telfer et al., 2018; Zhao et al., 2019)。

つまり本研究の RNA-seq データにも SNP が含まれると予想され、このことも実際よりも多く遺伝子が検出される原因になると考えられる。ただし、これらの中から注目する遺伝子、本研究ではネオクリンと類似遺伝子を見つけられれば目的は果たされる。研究時点では配列が非常に似通っているためにアセンブラで構築されないことも懸念された NAS、NBS の配列がきちんと構築されたことで、概ね必要な遺伝子が得られたと判断した。さらには CD-Hit では、NAS と NBS は同じクラスタにまとめられてしまうことから、まとめすぎではないかとも考えた。このためネオクリンに類似する配列の選択に対してはクラスタリング前の全配列を候補とすることにした。重ねて、ネオクリングループの 6 遺伝子については qRT-PCR を実施してアSEMBルされた配列が実在することを確認した (表 4-7)。

クルクリゴとオオキンバイザサの転写物には、前述のようにクラスタリングされていない遺伝子や Trinity プログラムによってアイソフォームと判定される配列 (例えば C_16562_c1_g1 や C_17363_c2_g1) が含まれるとしても、多くのネオクリン類似遺伝子が含まれていた (図 4-5)。この多様性は、植物の進化に寄与することが知られている遺伝子重複の結果であると考えられる (Cannon et al., 2004; Copley, 2020; Dang & Van Damme, 2016; De Schutter et al., 2017; Fukushima et al., 2017; Panchy et al., 2016; Yan et al., 2018)。このような遺伝子重複が生じた場合、一般的には同じ転写調節制御下で複数の遺伝子を制御することが多い。ネオクリン遺伝子である *NBS* と *NAS* は、クルクリゴとオオキンバイザサの進化的な分岐の前に、縦列重複によって生じたパラログである可能性が示唆される。クルクリゴとオオキンバイザサにおける *NBS* と *NAS* 遺伝子の特徴については、表 4-8 にまとめた。クルクリゴとオオキンバイザサは共に、*NBS* と *NAS* 遺伝子、そしてレクチン活性のある GNA ファミリーの配列に類似した C_9931 シリーズの転写物を保有している。しかしながら、2 種の植物におけるそれらの発現レベルは大変異なっている様子が確認できた (図 4-5)。

一方で両種の発現量の違いは、発現タイミングが異なった結果だという可能性もある。各々果実 1 個から得られた RNA を解析しており、採集した瞬間の結果を観察しているようなものである。複数個の果実や果実の経時的なサンプルを得ること、さらには qRT-PCR 解析で今後の検証が必要である。

さらには両種の発現量の違いは、クルクリゴは人工授粉、オオキンバイザサはホルモン処理という 2 種類の方法で結実させたことに起因することも考えられる。例えばトマトでは IAA (インドール酢酸) や NAA を施用した果実では、これらを施用していない果実に比べて総可溶性固形物の増加や空洞果や扁平果の減少のような変化が観察された (Pramanik & Mohapatra, 2017)。

供試する果実の反復数や異なるステージの果実でサンプル数を増やすとともに、両種ともホルモン処理で結実させた果実で比較することでより詳細な発現量の違いを検討できるだろう。

第3章で述べたように、果実中のネオクリン含量の最大量は、果肉1gにつき1.3mgであった(図3-2)。ネオクリンはショ糖よりも重量比で約550倍甘いと見積もられており(Kant, 2005)、そこから算出すると、クルクリゴ果実の果肉1gには少なくとも715mgのショ糖が含有されている甘さになるものと推定される。一方、オオキンバイザサにおけるネオクリンのオーソログ遺伝子のTPM値は、クルクリゴで検出された数値のわずか1/60であったことから、オオキンバイザサ果実においては、果肉1gあたり22 μ g程度のネオクリンを含むと予想される。これはショ糖12mgと同じ甘さであると換算され、オオキンバイザサの果実は甘味がない一つの理由であると考えられる。

植物においてレクチンは一般的に、生体保護と貯蔵において重要な役割を担っていると考えられている(De Coninck & Van Damme, 2021; Van Damme et al., 2008)。従って、オオキンバイザサ果実において複数のレクチン遺伝子が高発現していることは、この植物におけるレクチンの重要な役割を反映していると考えられる。対照的に、オオキンバイザサにおいてネオクリンのオーソログの発現レベルが極めて低いことは、コードされるタンパク質の発現が、この種の果実内ではあまり有益な意味を持たないことを示唆している。

一方で、クルクリゴ果実においてレクチン活性を有することがアミノ酸配列から期待されるGNAファミリーは、オオキンバイザサとは対照的に、わずかな量しか発現していない。また両種の植物の外見的特徴が似ているにもかかわらず、ネオクリン遺伝子はクルクリゴでは高発現しているが、オオキンバイザサは極めて低発現であった。

このようなオーソログにおける発現量の違いは、これらの遺伝子のシスエレメントの突然変異に起因している可能性が考えられる(De Schutter et al., 2017; Jiang et al., 2010; Lambin et al., 2020; Li, 2009; Wittkopp & Kalay, 2011)。プロモーター、エンハンサー、サイレンサーを含むシスエレメントは、遺伝子発現の調節のために大変重要である。クルクリゴとオオキンバイザサが進化的に分岐した後でNBSとNAS遺伝子のシスエレメントの配列に変異導入が生じた、あるいはそれらの分岐を導いた遺伝子重複の過程で突然変異を獲得したりシスエレメントを失ったりした、などが、異なる発現パターンを導き出す要因の仮説として挙げられる。これらの2種の植物におけるゲノム情報をさらに解読することで、この仮説を検証していくことに繋がるであろう。

以上述べたように、クルクリゴとオオキンバイザサの果実の RNA-seq 解析と de novo アセンブリーによって、今回、多数のネオクリン類似遺伝子の存在を明らかにすることができた。遺伝子重複で生じた様々なネオクリンに關係する遺伝子の中で、いくつかの突然変異が生じ、結果として NBS と NAS をコードする遺伝子になった、というのが、クルクリゴに味覚修飾タンパク質ネオクリンが存在する理由になるのかもしれない。これら 2 種の *Curculigo* 属植物の果実の遺伝子発現を網羅的に調査することで、進化レベルでネオクリンの起源を明らかにする助けとなることが期待される。

表 4-8 2 種の *Curculigo* 属植物果実におけるネオクリングループ転写物のまとめ

	Transcript ID	Reference transcript	No. of substitutions (amino acid)	Heterodimerization (no. of Cys)	Lectin activity (no. of MBS*)	Taste modification	Expression (TPM**)
クルクリゴ	L_16562_c0_g1_i1 (NBS)	NBS	0	Yes (4)	No (0)	Yes	High (650)
	L_16562_c0_g1_i2 (NAS)	NAS	1	Yes (4)	No (0)	Yes	High (620)
	L_307_c0_g2_i1	C_9931_c0_g1_i1	1	Unknown (2)	Unknown (3)	Unknown	Very low (1.4)
	L_307_c0_g1_i1	C_9931_c0_g1_i1	1	Unknown (2)	Unknown (3)	Unknown	Very low (0.35)
オオキンバイザサ	C_16324_c0_g1_i1	NBS	6	Probably Yes (4)	Probably No (0)	Probably Yes	Low (8.0)
	C_16324_c0_g1_i2	NAS	0	Probably Yes (4)	Probably No (0)	Probably Yes	low (11)
	C_9931_c0_g1_i1	C_9931_c0_g1_i1	-	Unknown (2)	Unknown (3)	Unknown (Fruits have no activity)	Very high (15,000)

* MBS: マンノース結合サイト

** TPM: transcripts per million

第 5 章

総合討論

本研究では、味覚修飾タンパク質ネオクリンの大量生産を目標とし、これを産生するクルクリゴを栽培し、結実に関する習性や、成熟特性を把握することをまず目指した。それらの知見を元にし、植物体からネオクリンの起源にせまることも試みた。

第2章では、クルクリゴの開花条件、花の形態を観察し、自家受粉と他家受粉の結実率を比較した。この結果、クルクリゴの開花は日本における今回の温室栽培条件では温度に依存し、20℃以上の高温条件が必要であることが明らかとなった。さらに花の形態から、早く開花する花序の基部近くでは両性花であり、先端に向かって開花するに従い雄性花に変化していくこと、両性花から雄性花の変化は急激であること、両性花の開花期間は約20日間であることが明らかとなった。自家受粉と他家受粉では、他家受粉の結実率が有意に高かった。

第3章では、果実の成熟ステージにおけるそれぞれのネオクリン含量を測定し、果実のどの部分にネオクリンが蓄積されるのかを解明した。その結果、開花から成熟まで10週間を要することや、成熟時のネオクリン含量が果肉1g中1.3mgになることが明らかとなった。ネオクリンは、果実の先端よりも種子に近い基部に多く、細胞間に蓄積されている様子を見出した。また得られたクルクリゴ果実中には、糖鎖修飾の異なる複数種類のNAS-NBSダイマーが存在することが示された。

第4章では、クルクリゴの比較対象としてオオキンバイザサを選択し、ネオクリン以外のタンパク質も含めた果実に発現する遺伝子の網羅的な解析をNGSを用いて行った。その結果、クルクリゴとオオキンバイザサの双方で、ネオクリンとネオクリン類似配列を共通に有することが明らかとなった。しかし発現量に着目すると両種間で大きな差が認められ、例えばクルクリゴでは大量に発現するネオクリンはオオキンバイザサではごく微量しか発現されなかったり、オオキンバイザサに大量に発現するネオクリンに極めてよく似た推定レクチンはクルクリゴではわずかであるなど、明確な発現量の相違に関する特徴も確認できた。これらの結果から、発現量が異なる理由として、遺伝子重複やシスエレメントの変異などが関わっているという仮説を提唱することができた。

以下、今回の解析を通じて得られた知見から、今後の展望を中心に考察していく。

クルクリゴの果実生産量の向上

本研究では、一般的には栽培化されていない野生植物であるクルクリゴについて、栽培条件下での開花習性や結実特性を明らかとした。今回得られた知見をもとに考察すると、クルクリゴの年間における果実生産量を高めるためには、果実の数を増やす、1つ1つの果実を大きくして重

くする、といった方針が想定される。果実の数を増やすためには、1 株に付く花序を増やす、1 花序毎の花数を増やす、両性花を増やす、授粉成功率を高める、などが実施可能な方策として挙げられる。また、果実を大きくするには、抜本的な品種改良の他に、多すぎない適切な個数に果実を制限することなどが考えられる。

一方で、花序や花数を増やすには、厳格な肥培管理が求められる。しかしクルクリゴは野生植物であるため、野菜のような栽培体系については、現在までのところ確立されていない。株を栽植する物理的間隔、施肥の量と時間的タイミング、日々の遮光条件など、温室栽培を行っていく上でコントロールできる要素は多数、存在する。現状でも、生育期間中の施肥により植物体の生長量は増大することは確認できていることを考えると、限界量にまで施肥を増やすことなどは、すぐにでも検討可能なパラメータであると考えられる。

クルクリゴ果実の成熟期間

本研究の観察では、クルクリゴの果実が成熟するには、開花から 10 週間を要することが分かった (図 3-2B)。一方でこれまでも述べてきたとおり、Nakajo et al. (1992) が報告したクルクリゴ果実の成熟に必要な期間が約 4 週間であるという報告と、今回の結果は大きく異なっている。Nakajo et al.は横浜国立大学にて栽培を実施したと報告しているが、この違いは栽培条件の違いというよりも、系統の違いにより大きな差が生じた可能性が高いとも考えられる。

一方で、山科植物資料館で所有している、他の系統のクルクリゴを用いた場合にも、本実験で使用した系統と同様の成熟期間が必要であった。もし早熟の系統が存在するなどの知見が得ることができたならば、その系統を育種に有効利用することが望ましいと考えている。

ネオクリンのバリエーションについて

第 3 章の解析において、果実中において糖鎖が付加しないネオクリンバリエーションの存在が示された (図 3-4)。ここで第 4 章から次世代シーケンスデータが得られたことから配列の比較を試みた。すなわち、Shirasuka et al., 2004 によれば N グリコシル化サイトは NAS の 81NGT83 である。しかし図 4-7、図 4-8 に示したようにこの部位は公開データベース、およびクルクリゴとオオキンバイザサの NAS (L_16562_c0_g1_i2、C_16324_c0_g1_i2)において一致していた。また核酸配列 (図 4-9、307AACGGCACG315) でも差異は見られなかった。現時点では mRNA のバリエーションは存在せず第 3 章 41 ページで考察したように、81NGT サイトで転写後にグリコシル化の欠損が生じた可能性が高い。

また、第 3 章でも考察したように、ネオクリンの糖鎖付加の有無については、味覚修飾活性の強度にさほど影響しないと考えられる。しかし、このネオクリンバリエーションは、クルクリゴで生

産されるネオクリンのどのくらいを占めているのか、また、その他にもバリエーションがあるのかについては、現時点では不明である。

前項で述べた果実の成熟期間も含め、日本国内で扱われてきたクルクリゴの個体数（系統数）が極めて少ないことが、これらの疑問点を残す最大の理由となってしまう。第 1 章で述べたように、原産地であるマレーシアにおいては、クルクリゴの系統の多様性を調べた研究も行われている(Babaei et al., 2012; Raden et al., 2017; Ranjbarfard et al., 2014)。しかし、果実収量の差異やネオクリンの生産能力、あるいはネオクリンバリエーションについて調査した解析はまだ報告がないのが現状である。可能であれば原産地に出向き、広範囲の個体からネオクリンを得て、今回実施したような幅広い解析をすることが、解決策の一つとして考えられる。

ネオクリンに類似するタンパク質について

第 4 章では、NGS を用いることで、果実中に発現するタンパク質を網羅的に解析した。ネオクリンがクルクリゴにのみ存在するのか、他の近縁植物にも存在するのかという疑問点については、クルクリゴとオオキンバイザサの双方に存在することを明らかにすることができた(図 4-5)。またネオクリンに限らず、これに類似したネオクリン様配列の遺伝子も、2 種の植物に共通に存在することから、これらの遺伝子配列がクルクリゴとオオキンバイザサが進化的に分岐する以前から存在することも推定された。

これらの遺伝子配列が近縁植物にどのくらいの範囲まで存在しているのかについても、興味深い研究課題である。例えば、図 1-4 に示した *Curculigo* clade の範疇にとどまっているのか、キンバイザサ科全体に広く存在しているのかについては、調査する必要があるであろう。例えば、キンバイザサ科のアツツザクラ (*Rhodohypoxis baurii*) やコキンバイザサ (*Hypoxis aurea*) は、液果である *Curculigo* とは異なり乾果であるため、多汁の果肉を持たない(The Royal Horticultural Society, 1992a, 1992b)。このことから、ネオクリンやその類似配列は、液果を作る植物種 (*Curculigo* clade) にのみ存在するという可能性も考えられる。

今回の解析では、少なくともネオクリンは果実中に多量に含まれることを示したが、その他の類似タンパク質が果実以外の場所にも含まれるのかどうかについては、本研究では明らかにできなかった。ネオクリンと類似タンパク質の植物体内での分布は、これらタンパク質の生理学的機能を推定する上での判断材料となりうるだろう。

一方、ネオクリングループに属するレクチン様配列 C_9931 シリーズは、3 か所の MBS においてマンノース結合に必要なアミノ酸モチーフを全て保存していた(図 4-7A)。このため、C_9931 シリーズはクルクリゴの祖先種に由来存在していたレクチンそのものか、その祖先タンパク質に非常に近縁なものであるのかということが、強く推定される。C_9931 の構造推定を行

うと、ネオクリンに次いで PCL (*Polygonatum cyrtonema lectin*) (Ding et al., 2010) と最も近いことが分かった (図 5-1)。すでに PCL については結晶構造が解かれていることから、C_9931 の構造について、詳細な立体構造を分子モデリングの手法などで検討できるかもしれない。また AlphaFold (Jumper et al., 2021) のような AI を用いた構造推定も現在では行われており、このような技術により役割推定やネオクリンとの構造比較も可能となっていくであろう。

ネオクリンの役割・機能について

ネオクリンがクルクリゴの中でどのような役割を果たしているか、という命題を解決する上で、今回実施した NGS による網羅的解析により各遺伝子の発現レベルが判明したことは、大きな前進になったと考えている。今回の解析結果から判断すると、クルクリゴに含まれるネオクリンは、解析した転写物の中では高発現とみなしうる上位の発現レベルであった。このことは、図 3-2、図 4-8 で示したように、果実から NaCl を用いて抽出される粗タンパク質抽出において、ネオクリンが主要タンパク質の一つになるという実験結果とは矛盾しない。今回明らかにしたネオクリン様タンパク質の発現プロファイルも、ネオクリンの機能推定の手がかりの一つになるものと考えられる。

ネオクリンやネオクリン類似アミノ酸配列において、クルクリゴとオオキンバイザサでそれぞれのオーソログの発現量が大きく異なるという知見は、「これらが同じ発現制御下にある」という仮説を支持するものであるとも考えることもできるのではないだろうか。これらの 2 種の植物において、同一のシスエレメントが機能していても、クルクリゴでは促進的なものがオオキンバイザサでは抑制的であったり、また違うシスエレメントはそれと正反対なことが起きたりしているという仮説の方が、今回の解析結果の全体像をうまく説明できる可能性はないだろうか。今後、幅広いゲノム解析を実施することによって、シスエレメントとして機能するゲノム DNA 配列を相互比較することができれば、ここで述べた仮説の妥当性を説明できるかもしれない。また、全ゲノム配列解析を行うことで、進化の過程や分岐の年代も推定できるのではないかとと思われる。

オオキンバイザサにおいては、ネオクリンに極めて良く似ていてマンノース結合サイトを持つ C_9931 シリーズが大量に発現していることを、今回の解析で初めて見出した (図 4-5)。そのアミノ酸配列から考慮すると、このタンパク質はレクチンとしての活性を有していることが想定され、生体内では防御物質または貯蔵物質としての役割を果たしていることが、強く推定される。一方で、クルクリゴ植物体においては、このレクチンのオーソログは極めて低いレベルでしか発現しておらず、また他のレクチン活性を有するタンパク質も果実中には発現していないことが、今回の解析結果から示された。これらの知見を総合的に勘案すると、C_9931 シリーズ

はクルクリゴにとって、生育に必ずしも必須なわけではないと考えられる。もし C_9931 が重要な防御物質として植物にとって必要であるのならば、クルクリゴではネオクリンがその代わりに防御物質となるか、クルクリゴは防御物質が無くても全く問題ないのか、ということになってしまう。現時点では、ネオクリンが抗菌などの防御的役割を果たしているとは考えられてはおらず、クルクリゴが当該レクチンの代わりとしてどのような防御機構を備えているのか、興味深い。

一方で、ネオクリンが貯蔵物質に関する機能を果たしている可能性もある。特に第 3 章で考察したようにネオクリンは種子散布者に果実を捕食されるために蓄積される可能性もある。このとき、ネオクリンは甘味物質として何らかの意味を有すると想定した時も、ネオクリンはヒトには甘く感じられるもののマウスでは甘味として働かないということも知られている(Koizumi et al., 2007)。従って、クルクリゴの果実は、野生状態で遭遇する陸上生物にとって、甘いと思ってもらえているのかについては大いに疑いが持たれる。さらには、植物は動物に好まれるように果実の色や匂い、大きさなどを進化させた(Valenta & Nevo, 2020; Zwolak & Sih, 2020)が、クルクリゴの果実は白色で匂いも乏しく哺乳類や鳥類が一般に好む形質とは異なるようである。少なくとも、山科植物資料館での栽培下でネオクリン果実を食する事実が観察できたのは、成熟果実を食害するナメクジだけであった。原産地であるマレーシアで、どのような動物がクルクリゴ果実を食べたことがあるのかという記録も、ネオクリンの役割を推定するために重要な情報だと考える。そもそも、捕食以外の種子散布も考えられる。山科植物資料館の栽培下では、果実が自然に崩壊して土中に埋もれるため、株の周囲の花序が存在した場所から発芽する。野生状態では果実が捕食されて糞に混じる形で散布されるのか、アリのような昆虫が種子を運ぶのか、もっと異なる方法で散布されるのかは、野外での記録が待たれる。

近年、味覚修飾物質の一つでありミラクルフルーツの果実に存在するタンパク質であるミラクリンについて、その生理機能に関する研究が発表された(Yang et al., 2021)。ゲノムシーケンスと加重遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)、濃縮および代謝物相関の統合解析により、ミラクリンは植物の成長、種子の発芽・成熟、病原菌感染への抵抗、環境圧力などを制御する役割を担っている可能性が示唆された。ネオクリンについても、同様の解析手法を導入することで、その役割を推定できる可能性がある。

また本研究では、クルクリゴ以外の同属植物としてオオキンバイザサの 1 種類しか供試することができなかった。他の同属植物あるいは範囲を広げて同じキンバイザサ科の植物に対しても同様にネオクリン類似配列を探索し、その配列の詳細や機能をネオクリンと比較することは、ネオクリンの進化や存在理由に結びつく様々な知見を得られるものと期待できる(図 5-2)。

日本国内で栽培されるクルクリゴからでも、全ゲノム配列情報などを利用すれば、今までに分かっていない様々な情報を引き出すことができる。今後も栽培技術を向上させることを念頭に入れつつ、新たな園芸的利用を計りたい。一方で、日本国内ではわからない野生での生育環境や、他の生物の相互作用の解明といった課題を解決するためには、原産地（マレーシア）に出向いての調査が必要となるであろう（図 5-3）。

ヒトに味覚修飾作用を与えるネオクリンが、進化の過程で偶然で生まれたかもしれないが、現実的に果実中にある程度大量に蓄積されているということから考慮すると、このタンパク質には何らかの生理学的役割が備わっており、少なくともクルクリゴ植物体の生存に不利に働くものではないと考えている。ネオクリンの存在理由として、ヒトに対する味覚修飾以外の機能を見出すことは、植物に広く存在するレクチンの存在理由の解明にもつながっていくのではないかと期待している（図 5-3）。本研究で得られた知見が、様々な研究者に利用しうるものとなることを強く願って、本論文の結語としたい。

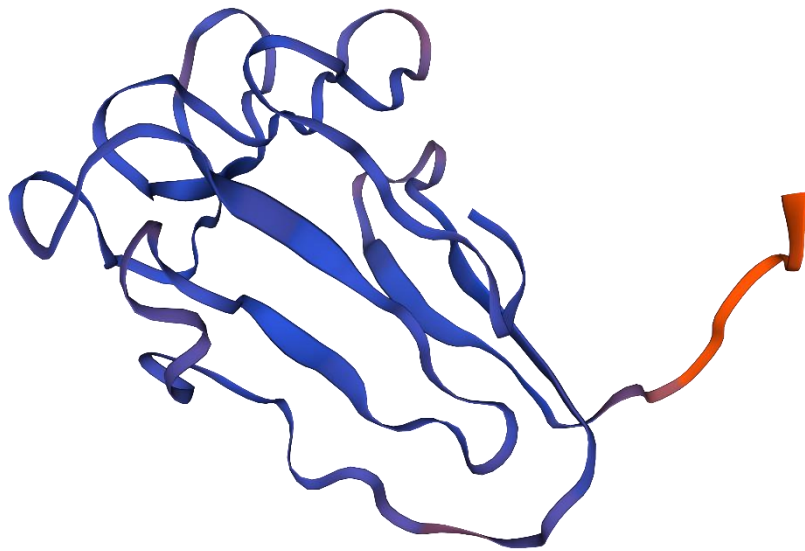


図 5-1 PCL (*Polygonatum cyrtonema* lectin, 3a0e.1.A) をテンプレートにして推定されたオオキンバイザサのネオクリン類似アミノ酸配列である C_9931_c0_g1_i1 の構造の 1 例モデリングには SWISS-MODEL を使用した。



図 5-2 日本新薬株式会社山科植物資料館が 2022 年に導入したキンバイザサ *Curculigo orchioides*
中央に写る乳白色楕円形のものは果実(果実の長さはおよそ 3cm)。



図 5-3 今後の研究をまとめたイラスト
マレーシアの地図は Ranjbarfard et al., 2014 から引用

参考文献

- Abe, K., Yamashita, H., Arai, S., & Kurihara, Y. (1992). Molecular cloning of curculin, a novel taste-modifying protein with a sweet taste. *Biochim Biophys Acta*, *1130*(2), 232-234. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(92\)90537-a](https://doi.org/10.1016/0167-4781(92)90537-a)
- Asif, M. (2012). A review on phytochemical and ethnopharmacological activities of *Curculigo orchioides*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, *39*(3-4), 1-10.
- Babaei, N., Abdullah, N. A., Saleh, G., & Abdullah, T. L. (2012). Isolation and characterization of microsatellite markers and analysis of genetic variability in *Curculigo latifolia* Dryand. *Mol Biol Rep*, *39*(11), 9869-9877. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1853-z>
- Babaei, N., Abdullah, N. A. P., Saleh, G., & Abdullah, T. L. (2014). An efficient in vitro plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Curculigo latifolia*, a medicinal plant. *ScientificWorldJournal*, *2014*, 275028. <https://doi.org/10.1155/2014/275028>
- Backer, C. A., & Bakhuizen van den Brink, R. C. (1968). *Flora of Java* (Vol. 3). Wolters-Noordhoff N.V. Groningen, the Netherlands.
- Barre, A., Van Damme, E. J. M., Peumans, W. J., & Rougé, P. (1997). Curculin, a sweet-tasting and taste-modifying protein, is a non-functional mannose-binding lectin. *Plant Mol Biol*, *33*(4), 691-698. <https://doi.org/10.1023/a:1005704616565>
- Burkill, I. H. (1966). *A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula*. Crown Agents for the Colonies.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, *4*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-10>
- Copley, S. D. (2020). Evolution of new enzymes by gene duplication and divergence. *FEBS J*, *287*(7), 1262-1283. <https://doi.org/10.1111/febs.15299>
- Dai, C., & Galloway, L. F. (2012). Male flowers are better fathers than hermaphroditic flowers in andromonoecious *Passiflora incarnata*. *New Phytol*, *193*(3), 787-796. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03966.x>
- Dai, Z. W., Vivin, P., Robert, T., Sylvie Milin, Hua Li, S., & Genard, M. (2009). Model-based analysis of sugar accumulation in response to source - sink ratio and water supply in grape (*Vitis vinifera*) berries. *Functional Plant Biology*, *36*(6), 527-540.

- <https://doi.org/10.1071/FP08284>
- Dang, L., & Van Damme, E. J. M. (2016). Genome-wide identification and domain organization of lectin domains in cucumber. *Plant Physiol Biochem*, *108*, 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.07.009>
- Danilova, V., & Hellekant, G. (2006). Elucidating coding of taste qualities with the taste modifier miraculin in the common marmoset. *Brain Res Bull*, *68*(5), 315-321. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.09.008>
- De Coninck, T., & Van Damme, E. J. M. (2021). Review: The multiple roles of plant lectins. *Plant Sci*, *313*, 111096. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2021.111096>
- De Schutter, K., Tsaneva, M., Kulkarni, S. R., Rougé, P., Vandepoele, K., & Van Damme, E. J. M. (2017). Evolutionary relationships and expression analysis of EUL domain proteins in rice (*Oryza sativa*). *Rice (N Y)*, *10*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0164-3>
- Deepankumar, S., Karthi, M., Vasanth, K., & Selvakumar, S. (2019). Insights on modulators in perception of taste modalities: a review. *Nutr Res Rev*, *32*(2), 231-246. <https://doi.org/10.1017/S0954422419000118>
- Ding, J., Bao, J., Zhu, D., Zhang, Y., & Wang, D. C. (2010). Crystal structures of a novel anti-HIV mannose-binding lectin from *Polygonatum cyrtoneura* Hua with unique ligand-binding property and super-structure. *J Struct Biol*, *171*(3), 309-317. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.05.009>
- Dong, T., Xiong, B., Huang, S., Liao, L., Qiu, X., Sun, G., He, Y., Duan, C., Wang, X., Zhang, X., Li, S., Zhu, J. & Wang, Z. (2019). Investigation of the cause of reduced sugar content in Kiyomi tangor fruit of Ziyang xiangcheng (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) rootstock. *Sci Rep*, *9*(1), 19263. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55957-3>
- Eksomtramage, L., Kwandarm, M., & Purintavaragul, C. (2013). Karyotype of some Thai Hypoxidaceae species. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, *35*(4), 379-382.
- Fukushima, K., Fang, X., Alvarez-Ponce, D., Cai, H., Carretero-Paulet, L., Chen, C., Chang, T. H., Farr, K. M., Fujita, T., Hiwatashi, Y., Hoshi, Y., Imai, T., Kasahara, M., Librado, P., Mao, L., Mori, H., Nishiyama, T., Nozawa, M., Pálfalvi, G., Pollard, S. T., Rozas, J., Sánchez-Gracia, A., Sankoff, D., Shibata, T. F. Shigenobu, S., Sumikawa, N., Uzawa, T., Xie, M., Zheng, C., Pollock, D. D., Albert, V. A., Li, S. & Hasebe, M. (2017). Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with

- carnivory. *Nat Ecol Evol*, 1(3), 59. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0059>
- González, G., Aguilera, F., & D'Afonseca, V. (2020). Transcriptome profiling of raspberry (*Heliconia*, 6(8), e04518. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04518>
- Haas, B. J., Dobin, A., Li, B., Stransky, N., Pochet, N., & Regev, A. (2019). Accuracy assessment of fusion transcript detection via read-mapping and de novo fusion transcript assembly-based methods. *Genome Biol*, 20(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1842-9>
- Harada, S., Otani, H., Maeda, S., Kai, Y., Kasai, N., & Kurihara, Y. (1994). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of curculin. A new type of sweet protein having taste-modifying action. *J Mol Biol*, 238(2), 286-287. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1289>
- Hellekant, G., Ninomiya, Y., & Danilova, V. (1998). Taste in chimpanzees. III: Labeled-line coding in sweet taste. *Physiol Behav*, 65(2), 191-200. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00532-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00532-5)
- Hiura, A., Akabane, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., & Kurihara, Y. (1996). Taste-modifying triterpene glycosides from *Staurogyne merguensis*. *Phytochemistry*, 43(5), 1023-1027. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(96\)00385-8](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(96)00385-8)
- Holding, M. L., Margres, M. J., Mason, A. J., Parkinson, C. L., & Rokyta, D. R. (2018). Evaluating the Performance of De Novo Assembly Methods for Venom-Gland Transcriptomics. *Toxins (Basel)*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/toxins10060249>
- Hu, L., Hao, C., Fan, R., Wu, B., Tan, L., & Wu, H. (2015). De Novo Assembly and Characterization of Fruit Transcriptome in Black Pepper (*Piper nigrum*). *PLoS One*, 10(6), e0129822. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129822>
- International Rice Genome Sequencing Project. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793-800. <https://doi.org/10.1038/nature03895>
- Ishak, N. A., Ismail, M., Hamid, M., Ahmad, Z., & Abd Ghafar, S. A. (2013). Antidiabetic and Hypolipidemic Activities of *Curculigo latifolia* Fruit:Root Extract in High Fat Fed Diet and Low Dose STZ Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 601838. <https://doi.org/10.1155/2013/601838>
- Ismail, M. F., Abdullah, N. A. P., bin Saleh, G., & Ismail, M. (2010). Anthesis and Flower Visitors in *Curculigo latifolia* Dryand. *Journal of Biology & Life Sciences*, 1(1), 13-15.
- Jany, E., Nelles, H., & Goring, D. R. (2019). The Molecular and Cellular Regulation of

- Brassicaceae Self-Incompatibility and Self-Pollen Rejection. *Int Rev Cell Mol Biol*, *343*, 1-35. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.011>
- Jiang, S. Y., Ma, Z., & Ramachandran, S. (2010). Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. *BMC Evol Biol*, *10*, 79. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-79>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kant, R. (2005). Sweet proteins--potential replacement for artificial low calorie sweeteners. *Nutr J*, *4*, 5. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-4-5>
- Kao, T. H., & Tsukamoto, T. (2004). The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, *16* Suppl(Suppl), S72-83. <https://doi.org/10.1105/tpc.016154>
- Kocyan, A., Snijman, D. A., Forest, F., Devey, D. S., Freudenstein, J. V., Wiland-Szymańska, J., Chase, M. W., & Rudall, P. J. (2011). Molecular phylogenetics of Hypoxidaceae--evidence from plastid DNA data and inferences on morphology and biogeography. *Mol Phylogenet Evol*, *60*(1), 122-136. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.02.021>
- Koizumi, A., Nakajima, K., Asakura, T., Morita, Y., Ito, K., Shmizu-Ibuka, A., Misaka, T., & Abe, K. (2007). Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun*, *358*(2), 585-589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.171>
- Koizumi, T., Terada, T., Nakajima, K., Kojima, M., Koshihara, S., Matsumura, Y., Kaneda, K., Asakura, T., Shimizu-Ibuka, A., Abe, K., & Misaka, T. (2015). Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Sci Rep*, *5*, 12947. <https://doi.org/10.1038/srep12947>
- Kurimoto, E., Suzuki, M., Amemiya, E., Yamaguchi, Y., Nirasawa, S., Shimba, N., Xu, N., Kashiwagi, T., Kawai, M., Suzuki, E., & Kato, K. (2007). Curculin exhibits sweet-tasting and taste-modifying activities through its distinct molecular surfaces. *J Biol*

- Chem*, 282(46), 33252-33256. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700174200>
- Lambin, J., Ascii, S. D., Dubiel, M., Tsaneva, M., Verbeke, I., Wytynck, P., De Zaeytijd, J., Smagghe, G., Subramanyam, K., & Van Damme, E. J. M. (2020). OsEUL Lectin Gene Expression in Rice: Stress Regulation, Subcellular Localization and Tissue Specificity. *Front Plant Sci*, 11, 185. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00185>
- Li, S., Yu, J. H., Fan, Y. Y., Liu, Q. F., Li, Z. C., Xie, Z. X., Lie, Y. & Yue, J. M. (2019). Structural Elucidation and Total Synthesis of Three 9-Norlignans from *Curculigo capitulata*. *J Org Chem*, 84(9), 5195-5202. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00170>
- Li, X. Q. (2009). Developmental and environmental variation in genomes. *Heredity (Edinb)*, 102(4), 323-329. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.132>
- Madritsch, S., Burg, A., & Sehr, E. M. (2021). Comparing de novo transcriptome assembly tools in di- and autotetraploid non-model plant species. *BMC Bioinformatics*, 22(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04078-8>
- Murakami, K., Katsuhara, K. R., & Ushimaru, A. (2022). Intersexual flower differences in an andromonoecious species: small pollen-rich staminate flowers under resource limitation. *Plant Biol (Stuttg)*, 24(2), 259-265. <https://doi.org/10.1111/plb.13383>
- Muñoz-Sanz, J. V., Zuriaga, E., Cruz-García, F., McClure, B., & Romero, C. (2020). Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. *Front Plant Sci*, 11, 195. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00195>
- Nakajima, K., Asakura, T., Maruyama, J., Morita, Y., Oike, H., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S., Kitamoto, K. & Abe, K. (2006). Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol*, 72(5), 3716-3723. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3716-3723.2006>
- Nakajima, K., Asakura, T., Oike, H., Morita, Y., Shimizu-Ibuka, A., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S. & Abe, K. (2006). Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor. *Neuroreport*, 17(12), 1241-1244. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000230513.01339.3b>
- Nakajo, S., Akabane, T., Nakaya, K., Nakamura, Y., & Kurihara, Y. (1992). An enzyme immunoassay and immunoblot analysis for curculin, a new type of taste-modifying protein: cross-reactivity of curculin and miraculin to both antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1118(3), 293-297. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90287-n](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90287-n)

- Ngai, P. H., & Ng, T. B. (2007). A mannose-specific tetrameric lectin with mitogenic and antibacterial activities from the ovary of a teleost, the cobia (*Rachycentron canadum*). *Appl Microbiol Biotechnol*, *74*(2), 433-438. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0649-2>
- Nie, Y., Dong, X., He, Y., Yuan, T., Han, T., Rahman, K., Qin, L. & Zhang, Q. (2013). Medicinal plants of genus *Curculigo*: traditional uses and a phytochemical and ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol*, *147*(3), 547-563. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.066>
- Ohkubo, T., Tamiya, M., Abe, K., & Ishiguro, M. (2015). Structural Basis of pH Dependence of Neoculin, a Sweet Taste-Modifying Protein. *PLoS One*, *10*(5), e0126921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126921>
- Okubo, S., Asakura, T., Okubo, K., Abe, K., Misaka, T., & Akita, T. (2008). Neoculin, a taste-modifying sweet protein, accumulates in ripening fruits of cultivated *Curculigo latifolia*. *J Plant Physiol*, *165*(18), 1964-1969. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.019>
- Okubo, S., Terauchi, K., Okada, S., Saito, Y., Yamaura, T., Misaka, T., Nakajima, K., Abe, K., & Asakura, T. (2021). De novo transcriptome analysis and comparative expression profiling of genes associated with the taste-modifying protein neoculin in *Curculigo latifolia* and *Curculigo capitulata* fruits. *BMC Genomics*, *22*(1), 347. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07674-3>
- Okubo, S., Yamada, M., Yamaura, T., & Akita, T. (2010). Effects of the pistil size and self-incompatibility on fruit production in *Curculigo latifolia* (Liliaceae). *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, *79*(4), 354-359. <https://doi.org/https://doi.org/10.2503/jjshs1.79.354>
- Ooi, D. J., Chan, K. W., Sarega, N., Alitheen, N. B., Ithnin, H., & Ismail, M. (2016). Bioprospecting the Curculigoside-Cinnamic Acid-Rich Fraction from *Molineria latifolia* Rhizome as a Potential Antioxidant Therapeutic Agent. *Molecules*, *21*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules21060682>
- Ooi, D. J., Adamu, H. A., Imam, M. U., Ithnin, H., & Ismail, M. (2018). Polyphenol-rich ethyl acetate fraction isolated from *Molineria latifolia* ameliorates insulin resistance in experimental diabetic rats via IRS1/AKT activation. *Biomed Pharmacother*, *98*, 125-133. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.002>
- Ooi, D. J., Azmi, N. H., Imam, M. U., Alitheen, N. B., & Ismail, M. (2018). Curculigoside and polyphenol-rich ethyl acetate fraction of *Molineria latifolia* rhizome improved glucose

- uptake via potential mTOR/AKT activated GLUT4 translocation. *J Food Drug Anal*, 26(4), 1253-1264. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.03.003>
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S. H. (2016). Evolution of Gene Duplication in Plants. *Plant Physiol*, 171(4), 2294-2316. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00523>
- Podolsky, R. D. (1993). Evolution of a Flower Dimorphism: How Effective is Pollen Dispersal by "Male" Flowers? *Ecology*, 74, 2255-2260. <https://doi.org/10.2307/1939578>
- Pramanik, K., & Mohapatra, P. P. (2017). Role of Auxin on Growth, Yield and Quality of Tomato - A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(11), 1624-1636. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.611.195>
- Raden, I., Nugroho, C., Catur, & Syahrani. (2017). Identification and characterization of morphological diversity of Lemba (*Curculigo latifolia*) in East Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 18. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180412>
- Ranjbarfard, A., Saleh, G., Abdullah, N. A. P., & Kashiani, P. (2014). Genetic diversity of lembe (*Curculigo latifolia*) populations in Peninsular Malaysia using ISSR molecular markers. *Australian Journal of Crop Science*, 8(1), 9-17.
- Sarma, B., Das, K., & Bora, S. S. (2020). Physiology of Fruit Development. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(6), 504-251. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.906.066>
- Schlessman, M. A., Uuderwood, N., Watkins, T., Graceffa, L. M., & Cordray, D. (2004). Functions of staminate flowers in andromonoecious *Pseudocymopterus montanus* (Apiaceae, Apioideae). *Plant Species Biology*, 19(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2004.00096.x>
- Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K., Iwata, S., Misaka, T., Sorimachi, H., Arai, S. & Abe, K. (2006). Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity. *J Mol Biol*, 359(1), 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.030>
- Shimizu-Ibuka, A., Nakai, Y., Nakamori, K., Morita, Y., Nakajima, K., Kadota, K., Watanabe, H., Okubo, S., Terada, T., Asakura, T., Misaka, T., & Abe, K. (2008). Biochemical and genomic analysis of neoculin compared to monocot mannose-binding lectins. *J Agric Food Chem*, 56(13), 5338-5344. <https://doi.org/10.1021/jf800214b>
- Shirasuka, Y., Nakajima, K., Asakura, T., Yamashita, H., Yamamoto, A., Hata, S., Nagata, S.,

- Abo, M., Sorhimachi, H. & Abe, K. (2004). Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*. *Biosci Biotechnol Biochem*, *68*(6), 1403-1407. <https://doi.org/10.1271/bbb.68.1403>
- Silva, R. R. S., Silva, C. R., Santos, V. F., Barbosa, C. R. S., Muniz, D. F., Santos, A. L. E., Santos, M. H. C., Rocha, B. A. M., Batista, K. L. R., Costa-Júnior, L. M., Coutinho, H. D. M., & Teixeira, C. S. (2019). *Parkia platycephala* lectin enhances the antibiotic activity against multi-resistant bacterial strains and inhibits the development of *Haemonchus contortus*. *Microb Pathog*, *135*, 103629. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103629>
- Steenis, C. G. G. J. v., ed., Steenis-Kruseman, M. J. v., Pertanian., I. D., Indonesia., K. R., & Indonesia., L. I. P. (1993). Flora Malesiana. Series I, Spermatophyta. In D. J. L. Geerinck (Ed.), *Flora Malesiana* (Vol. 11, pp. 366-370). <https://doi.org/10.5962/bhl.title.40744>
- Sugita, D., Inoue, R., & Kurihara, Y. (1998). Sweet and sweetness-inducing activities of new triterpene glycosides, strogins. *Chem Senses*, *23*(1), 93-97. <https://doi.org/10.1093/chemse/23.1.93>
- Suzuki, M., Kurimoto, E., Nirasawa, S., Masuda, Y., Hori, K., Kurihara, Y., Shimba, N., Kawai, M., Suzuki, E., & Kato, K. (2004). Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities. *FEBS Lett*, *573*(1-3), 135-138. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.073>
- Telfer, E., Graham, N., Macdonald, L., Sturrock, S., Wilcox, P., & Stanbra, L. (2018). Approaches to variant discovery for conifer transcriptome sequencing. *PLoS One*, *13*(11), e0205835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205835>
- The Angiosperm Phylogeny Group. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- The Royal Horticultural Society. (1992a). Hypoxis. In *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*. The Macmillan Press Limited, London.
- The Royal Horticultural Society. (1992b). Rhodohypoxis. In *The New Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*. The Macmillan Press Limited, London.
- Theerasilp, S., Hitotsuya, H., Nakajo, S., Nakaya, K., Nakamura, Y., & Kurihara, Y. (1989). Complete amino acid sequence and structure characterization of the taste-modifying

- protein, miraculin. *J Biol Chem*, 264(12), 6655-6659. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83477-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83477-9)
- Toji, T., Ishimoto, N., & Itino, T. (2020). Seasonal change of flower sex ratio and pollinator dynamics in three reproductive ecotypes of protandrous plant. *Ecosphere*, 11(9), e03251. <https://doi.org/10.1002/ecs2.3251>
- Traveset, A., & Jakobsson, A. (2007). *Ecology of Plant Reproduction: Mating Systems and Pollination* (Second Edition ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420007626>
- Valenta, K., & Nevo, O. (2020). The dispersal syndrome hypothesis: How animals shaped fruit traits, and how they did not. *Functional Ecology*, 34(6), 1158-1169. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13564>
- Van Damme, E. J. M., Lannoo, N., & Peumans, W. J. (2008). Plant Lectins. *Advances in Botanical Research*, 48, 107-209. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00403-5)
- Wang, K. J., Zhu, C. C., Di, L., Li, N., & Zhao, Y. X. (2010). New norlignan derivatives from *Curculigo capitulata*. *Fitoterapia*, 81(7), 869-872. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.05.012>
- Wittkopp, P. J., & Kalay, G. (2011). Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat Rev Genet*, 13(1), 59-69. <https://doi.org/10.1038/nrg3095>
- Xiong, R., Liu, C., Xu, M., Wei, S. S., Huang, J. Q., & Tang, H. (2020). Transcriptomic analysis of flower induction for long-day pitaya by supplementary lighting in short-day winter season. *BMC Genomics*, 21(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6726-6>
- Yamashita, H., Akabane, T., & Kurihara, Y. (1995). Activity and stability of a new sweet protein with taste-modifying action, curculin. *Chem Senses*, 20(2), 239-243. <https://doi.org/10.1093/chemse/20.2.239>
- Yamashita, H., Theerasilp, S., Aiuchi, T., Nakaya, K., Nakamura, Y., & Kurihara, Y. (1990). Purification and complete amino acid sequence of a new type of sweet protein taste-modifying activity, curculin. *J Biol Chem*, 265(26), 15770-15775. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55464-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55464-8)
- Yan, J., Li, G., Guo, X., Li, Y., & Cao, X. (2018). Genome-wide classification, evolutionary analysis and gene expression patterns of the kinome in *Gossypium*. *PLoS One*, 13(5), e0197392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197392>
- Yang, Z., Liu, Z., Xu, H., Chen, Y., Du, P., Li, P., Lai, W., Hu, H., Luo, J., & Ding, Y. (2021).

- The Chromosome-Level Genome of Miracle Fruit (*Synsepalum dulcificum*) Provides New Insights Into the Evolution and Function of Miraculin. *Front Plant Sci*, *12*, 804662. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.804662>
- Zhao, Y., Wang, K., Wang, W. L., Yin, T. T., Dong, W. Q., & Xu, C. J. (2019). A high-throughput SNP discovery strategy for RNA-seq data. *BMC Genomics*, *20*(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5533-4>
- Zwolak, R., & Sih, A. (2020). Animal personalities and seed dispersal: A conceptual review. *Functional Ecology*, *34*(7), 1294-1310. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13583>
- 荒井綜一、清水(井深)章子. (2007). 機能性食品の研究-回顧と展望. *日本乳酸菌学会誌*, *18*(1), 2-6. <https://doi.org/10.4109/jslab.18.2>
- 伊藤圭祐. (2008). 博士論文「味覚修飾タンパク質ミラクリンの発言系構築と構造生物学的解析」.
- 株式会社ナムコ. (2005). ヘルシー&ビューティな「ミラクルフルーツカフェ」11月22日オープン. <https://www.bandainamco.co.jp/releases/images/3/25399.pdf>
- 杉浦明、門屋一臣、新居直祐、仁藤伸昌、行永寿二郎、高木敏彦、水谷房雄、田辺賢二、山下研介、稲葉昭次、松井弘之. (1991). *新 果樹園芸学*. 朝倉書店.
- 鈴木芳夫、八鍬利郎、仲村俊一郎、高野泰吉、斎藤隆、藤重宣昭、岩田隆. (1993). *新 蔬菜園芸学*. 朝倉書店.
- 原島広至. (2017). *生薬単(ショウヤクタン)—語源から覚える植物学・生薬学名単語集 (改訂第3版)*. 丸善雄松堂.
- 平宏和、田島眞、安井明美、安井健 (2022). コーヒー. In *新版 日本食品大事典 第二版*. 医歯薬出版.
- 文部科学省 (2020). *日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂)*. Retrieved 13 May 2023 from https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html
- 山下治之. (1994). 博士論文「味覚修飾タンパク質クルクリンの構造解析、クローニングおよび工業生産」.
- 米森敬三、平智、菅谷純子、神崎真哉、鉄村琢哉、本杉日野、北島宣、江角智也、田尾龍太郎、坂井章浩、中野龍平、別府賢治、尾形凡生、福田文夫、中尾義則. (2015). *果樹園芸学*. 朝倉書店.

論文の内容の要旨

論文題目 クルクリゴの栽培を通じた味覚修飾タンパク質ネオクリンの生産とネオクリン遺伝子解析

氏 名 大久保 智史

クルクリゴ *Curculigo latifolia* は、東南アジアに生息するキンバイザサ科の多年草である。クルクリゴの果実には、酸味を甘味に変換する活性(味覚修飾活性)を持つ特徴的なタンパク質であるネオクリンが含まれる。ネオクリンは塩基性サブユニット (neoculin basic subunit, NBS) と酸性サブユニット (neoculin acidic subunit, NAS) から構成されるヘテロダイマーであり、各サブユニット間のアミノ酸配列の相同性は 77 % である。またネオクリンの各サブユニットは、スノードロップレクチンなどのマンノース結合レクチンとの相同性も極めて高いものの、レクチンファミリーに共通して存在する 3 か所のマンノース結合サイトを欠いている。そのため、ネオクリンはレクチン活性を有していない。

クルクリゴ植物体におけるネオクリンの生理機能は、いまだ明らかにされていない。ネオクリンがレクチンに類似している点から考慮すると、本来機能すべきレクチンが変異によりネオクリンに変化して同じ役割を担っているのか、変異しなかったレクチンとネオクリンが共存しているのかといった点についても、研究開始時点では不明であった。

これらはクルクリゴ植物が我が国に乏しく、果実などの試料を豊富に得られない点に原因の一つがあった。植物から容易にネオクリンを得られれば食品への利用も図れると考えられた。

そこで本研究は、クルクリゴ植物の栽培方法を確立し果実からネオクリンを得ることを目的に実施した。さらに得られた果実を利用した近縁種との遺伝子発現解析から、ネオクリンの植物体内における役割について知見を得ることも目指した。まず、国内栽培環境下におけるクルクリゴ果実の安定的な生産を目指し、開花および結実機構を解明した。次に、果実の各成熟段階における、果実中のネオクリン含有量の変化を明らかにした。最後に、本研究で得られたクルクリゴ果実と、同属のオオキンバイザサ *Curculigo capitulata* 果実における発現遺伝子の網羅的解析から、両植物種に含まれるネオクリンとその類似タンパク質の種類や発現量の差異について明らかにした。

クルクリゴの花の構造と果実生産の関係の解明

本項目ではクルクリゴ果実の安定的な生産を目指すため、クルクリゴ植物における結実条件の詳細な検討を行った。具体的には、温室内で自家栽培しているクルクリゴを対象として、クルクリゴの年間を通じた開花数の変化や、花序における花ごとの雄蕊と雌蕊の大きさの変化を観察した。また和合性を確認するため、人工的に同花授粉（自家受粉）と別株との授粉（他家受粉）を行い、両者の結実率についても比較を行った。

今回解析に使用した温室栽培条件下において、クルクリゴは年間を通して開花するものの、開花数は最低気温の影響を大きく受けること、また室温 20 °C 以上を必要条件とすることが明らかとなった。花序の中における開花条件を比較すると、根元から先端に向けて徐々に開花する様子が観察された。花序の低い位置の花は雄蕊よりも雌蕊が長い両性花であり、途中から雄蕊よりも雌蕊が短い雄花に変化していた。両性花から雄花へ変化するのは、花序の最初の花が咲いてからおよそ 20 日後のことだった。

開花したクルクリゴの花に対して人工授粉を実施したところ、自家授粉による結実率が 4 %、他家受粉による結実率が 45 %であったことから、自家不和合性であることが推定された。両性花への他家受粉を継続的に続けたところ、結実率が高かったのは花序が咲き始めた初日から 5 日の間に開花した花であり、6 日以降に開花した花では両性花であっても、結実率は徐々に低下した。

以上得られた知見から、我が国でクルクリゴ果実を安定的に採取するためには、クルクリゴの栽培環境として温室で 20 °C 以上の高温を維持し、花序の開花初期に積極的な人工授粉による他家受粉を実施することが必要であることが明らかとなった。

クルクリゴの果実に含まれるネオクリンの分布と含量の解析

クルクリゴ果実におけるネオクリンの生理機能を推測するため、果実の各成熟段階におけるネオクリン含有量の変化について解析した。温室栽培により結実したクルクリゴ果実を用いて、果実の成熟段階ごとのネオクリン含量を測定し、含量が最大となる時期を推定した。また抗体染色を行い、果実のどの部分にネオクリンが蓄積されるのかを解明した。さらには、果実から得られたネオクリンタンパク質の糖鎖修飾の有無についても解析を行った。

外見の観察では、果実の成熟には授粉後およそ 12 週間を要することから、授粉から 2 週ごとにサンプリングを行った。果実中タンパク質に含まれるネオクリンの存在量を経時的に解析したところ、ネオクリン含有量は授粉 10 週後が最も高いことが示され、この時のネオクリン量は果肉 1 g 中 1.3 mg であった。

抗体染色の結果、ネオクリンは果実全体に広く分布していたが、特に基部に近い細胞間隙に多く含まれることが示された。一方、糖タンパク質染色を行ってみると、本果実にはこれまで報告されていた N 結合型グリコシル化 NAS の他に、非グリコシル化 NAS が存在することが明らかとなった。このことは、栽培されるクルクリゴ果実中には、糖鎖修飾の異なる複数種類の NAS-NBS ダイマーが存在することが示唆された。

クルクリゴとオオキンバイザサの果実におけるネオクリンとネオクリン類似遺伝子の比較解析

これまでの研究によって、温室で自家栽培したクルクリゴを人工授粉により結実させることで、ネオクリンを十分に蓄えた果実が安定的に得られるようになった。クルクリゴ果実中における発現遺伝子プロファイルについて、同属植物であるオオキンバイザサの果実における発現遺伝子との比較を試みた。mRNA シーケンスに次世代シーケンサーを利用することで、両種におけるネオクリンやその類似タンパク質の種類と発現量の比較を行った。

両果実における遺伝子発現プロファイルは、全体を通して概観すると、発現するタンパク質の種類や発現レベルに大きな違いは認められなかった。レクチンに注目してみると、植物に共通して存在する 12 のレクチンファミリーのうち、ABA、Amaranthin、Cyanovirin、Ricin-B の各ファミリーの遺伝子発現が認められないことが、両果実において共通していた。ネオクリンが類似する GNA ドメインについては、クルクリゴではドメイン中最多の 10 遺伝子が存在していた。一方、オオキンバイザサでは GNA ドメインに 13 遺伝子が存在しており、Legume ドメインに含まれる 16 遺伝子に次ぎ 2 番目に多く見つけられた。これらを含め、NAS・NBS と一致度の高いクルクリゴの 10 遺伝子とオオキンバイザサの 15 遺伝子の各アミノ酸配列について、アラメント解析および遺伝子発現量の比較解析をおこなった。

この結果、クルクリゴとオオキンバイザサは、ともに NAS、NBS を有していることが示されるとともに、他のアミノ酸配列も多くが両種で共通していた。しかしながらそれらの発現量を比較すると、一方の種で多量に発現するものは他方の種では少量しか発現しておらず、逆に一方の種で少量の発現であるものが他方では大量に発現しているという、顕著な特徴が認められた。クルクリゴにおける NAS、NBS の発現量は、オオキンバイザサにおける発現量の 500 倍以上であった。一方 NAS、NBS に最も近いレクチン遺伝子については、オオキンバイザサの全転写物の中で 5 番目に多い一方で、クルクリゴでの発現量はオオキンバイザサの 15000 分の 1 だった。

以上、得られた知見をまとめると、ネオクリン類似遺伝子の多様性については、進化の中で遺伝子重複が起こったことを強く示唆するものであった。2 種の植物種の果実における遺伝子発現プロファイルの著しい違いは、転写制御の部位に突然変異を生じたためであると考えられた。

まとめ

本研究ではクルクリゴ植物の結実習性、成熟過程を解明することにより、我が国における温室栽培環境下で、クルクリゴ果実を安定的に生産することができるようになった。さらには得られた果実を利用して、mRNA 解析も可能となった。その結果、ネオクリンはクルクリゴ以外の同属植物であるオオキンバイザサにもごく微量含まれることが明らかになった一方で、クルクリゴ果実にのみ大量にタンパク質が存在することが明らかとなった。

今後は栽培の拡大や栽培技術の確立によってクルクリゴ果実ひいてはネオクリンの増産を目指すとともに、ゲノム解析や、他のクルクリゴ近縁種に調査対象を拡大することで、ネオクリンの存在理由やネオクリン類似配列を含むマンノース結合レクチン類似タンパク質に対して新たな知見を得ることが期待できる。

謝辞

クルクリゴと出会ってからこれまで、本業の植物園管理から多少離れながらも、日本新薬株式会社山科植物資料館で自由な活動をさせていただきました。歴代館長の西豊之博士、秋田徹博士、ならびに現館長の山浦高夫博士には大変感謝しております。ありがとうございました。山田充子さんには、クルクリゴの栽培をはじめ、温室管理の先輩として様々に助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり生物機能開発化学研究室の阿部啓子教授(当時)、三坂巧准教授には、様々にご協力をいただきました。研究の方向性に悩んでご相談する度に、次もやれると勇気づけられました。次いで研究の具体的な補助を下さいました味覚サイエンス研究室の朝倉富子教授(当時)には、終止サポートをいただきました。厚く御礼申し上げます。

同、寺内かえで博士には NGS データの扱いに手をこまねく私を導き、論文投稿まで叱咤続けて下さいました。斉藤芳和博士には泳動などウェットな実験で指導いただきました。追加試験では、斉藤博士の指示なしには達成できませんでした。岡田晋治博士にはデータサイエンスの時流を教示いただき、適切な解析方法を提示いただきました。深く感謝申し上げます。

最後に、家事をさぼって論文執筆を行う私に協力してくれた妻靖子と息子圭介に感謝します。特に分かっているのかいないのか、「論文書けたの？」と無邪気にプレッシャを与えてくれた息子には、感謝すると共に、「ちゃんと書けたぞ」と本論文を示したいと思います。