

生きた植物から可溶性糖を取り出す： 糖輸送体SWEETと排水液による採取方法の検討

米倉 円佳¹, 青木 直大^{2*}, 廣瀬 竜郎^{2,3}, 大杉 立², 近藤 聡¹, 大音 徳⁴

¹トヨタ自動車アグリバイオ事業部, ²東京大学大学院農学生命科学研究科

³国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター

⁴トヨタ自動車T-フロンティア部

(2017年10月27日受付 2018年1月17日受理)

Extracting soluble sugars from living plants: Investigation of the sugar extraction method via the SWEET sugar transporter

Madoka Yonekura¹, Naohiro Aoki², Tatsuro Hirose³, Ryu Ohsugi², Satoshi Kondo¹, Chikara Ohto⁴ (*Biotechnology Dept., Agriculture & Biotechnology Business Div., Toyota Motor Corporation, 1099, Marune, Kurozasa-cho, Miyoshi, Aicuh, 470-0201*¹, *Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8657*², *Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization, 1-2-1, Inada, Jyouetsu, Niigata, 943-0193*³, *Center Management Dept., T-Frontier Div., Toyota Motor Corporation, 1, Toyota-cho, Toyota 471-8572*⁴) *Seibutsu-kogaku* **96**: 129–136, 2016.

To develop a methodology that leads to the reduction in the cost for obtaining bioproducts, we tried to extract sugars, the major products of photosynthesis, nondestructively from living plants. Our strategy was 1) to increase the sugar levels in the extracellular space (apoplast) of the leaves by promoting the efflux of intracellular sugars via a sugar efflux transporter, SWEET, and then 2) enhancing the exudation of sugar-rich apoplastic fluid from the leaf apoplasts to the exterior through guttation on the tips and margins of leaves.

Arabidopsis has 17 SWEET isogenes (*AtSWEETs*). In this study, we produced SWEET-overexpressing Arabidopsis for all the 17 *AtSWEETs*, and analyzed each transgenic line in light of the soluble sugar content of their guttation fluids. We found that CladeIII *AtSWEETs* had remarkably increased sugar levels in their guttation fluids. Among the CladeIII *AtSWEETs*, the guttation fluid from the *AtSWEET12*-overexpressed Arabidopsis showed the highest level of sugar: 10.2 ± 2.0 mM sugar (total monosaccharide equivalent; 3.1 ± 0.6 μ M in wild type). Furthermore, when the CladeIII *OsSWEET13* was overexpressed in rice, the guttation fluids contained 185.6 ± 32.8 mM sugar on average (4.9 ± 2.1 μ M in wild type). In conclusion, our two-step strategy using SWEET-overexpression and guttation, appears promising for extracting sugars nondestructively from living plants.

[**Key words**: SWEET, sugar transporter, bioproduct, sucrose, apoplast]

諸 言

ポリ乳酸などのバイオプラスチックやバイオエタノール

などのバイオ燃料は、いずれも植物の光合成産物である糖類（シヨ糖，デンプン，セルロースなど）から作られる。現状において、原料であるこれら糖類を取り出す

*連絡先 E-mail: aaokin@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ためには、収穫した植物体からの搾汁・抽出や収穫物の分解・発酵などが必要である。一方、製造コスト低減の観点からは微生物が資化しやすいショ糖、グルコース、フルクトースなどの可溶性糖が望ましく、しかもそれらを、植物を生かしたまま、非破壊で連続的に取り出せれば、更なるコスト低減が見込める。そこで本研究では、可溶性糖を植物から非破壊で採取することを最終目的とし、そのための基礎技術の開発を試みた。

可溶性糖のような細胞内で生産される物質を植物体から取り出すためには、まずステップ①として対象物質(糖)を細胞外(アポプラスト)に放出させ、ステップ②としてそれをアポプラストから植物体外に排出させることが必要である(Fig. 1A)。本研究では、ステップ①の細胞外への糖放出のための方策として、近年発見された糖輸送体であるSWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter)¹⁾を利用することを考えた。

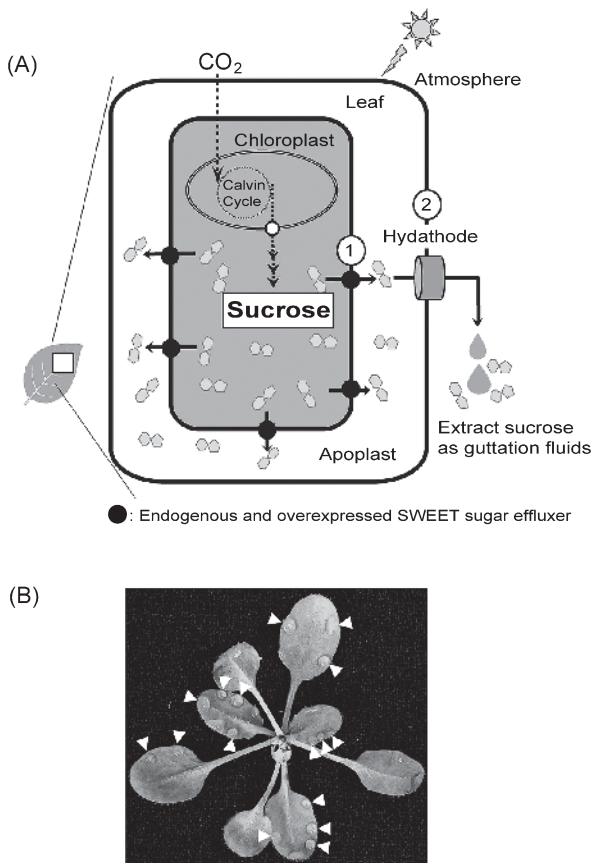


Fig. 1. The two-step strategy to extract sugars nondestructively by overexpressing SWEET sugar effluxers. (A). In step 1, sucrose, synthesized in the cytosol of a leaf cell, is effluxed into the apoplast via the SWEET sugar effluxer, located on the plasma membrane (①). In step 2, the apoplastic sucrose is exuded as guttation fluid via hydathodes on the tip and margins of a leaf (②). (B). A typical image of guttation fluids produced on the abaxial surfaces of the leaves of Arabidopsis. Such fluids were collected with a micro-pipette, and subjected to quantitative analysis of their sugar contents.

SWEETはシロイヌナズナの機能未同定であった膜タンパク質から発見された新しいタイプの糖輸送体で、少なくともそのいくつかはヒト胎児腎細胞やアフリカツメガエル卵母細胞に異種的に発現させた場合に糖を細胞内外に運ぶ活性を持つ¹⁾。シロイヌナズナのゲノムには4つのCladeに分類される17種類のSWEET遺伝子(*AtSWEET*)が存在するが¹⁾、これらのSWEET遺伝子は発現の器官特異性や細胞内局在性、およびショ糖や単糖など輸送する糖の特異性を異にし、植物体内のさまざまな糖輸送に重要な役割を果たしていると考えられる²⁻⁶⁾。

CladeI型の*AtSWEET2*はグルコース輸送活性を持ち、根圏への糖の放出を抑制する²⁾。CladeII型の*AtSWEET8*は花粉機能に必須である³⁾。CladeIII型の*AtSWEET9*は蜜腺分泌に関わる⁴⁾。同じくCladeIII型に属する*AtSWEET11*と*AtSWEET12*は葉の維管束師部周辺において細胞内ショ糖のアポプラストへの放出に寄与し、光合成産物であるショ糖の他器官への移動(転流)に関わる⁵⁾。CladeIV型の*AtSWEET17*は葉内のフルクトース濃度の調節に関与する⁶⁾。また*AtSWEET*の細胞内局在性について、CladeI型の*AtSWEET2*とCladeIV型の*AtSWEET16, 17*は液胞膜に^{2,6)}、CladeI型の*AtSWEET1, CladeII*型の*AtSWEET4, 5, 8*およびCladeIII型の*AtSWEET9, 11, 12, 15*が原形質膜に局在することが報告されている^{1,3-5,7,8)}。これらのことが明らかとなっている一方、他の*AtSWEET*についてはその生理機能がわかっていない。

次に、ステップ②のアポプラストから植物体外への糖取り出し方法として葉からの排水(guttation)に着目した(Fig. 1)。排水は、根による水分吸収量が葉からの蒸散量を上回った際に、余剰となった水分が葉の先端部や周縁部に存在する排水組織を介して溢出する現象で⁹⁾、条件を整えれば、シロイヌナズナの葉裏にも数多くの水滴(排水液)が見られる(Fig. 1B)。排水組織は、大型の道管節、水孔、およびそれらを連絡する細胞間隙からなる¹⁰⁾。排水組織において植物体外への出口となっている水孔は、気孔が大型化したような形状をしているが、気孔の孔辺細胞が環境に応じて開閉するのに対して、水孔の孔辺細胞は開閉できず常に開いたままとなっている⁹⁾。排水現象は、根の吸水力および葉の蒸散量と密接に関係しているため、地温が高く、湿度が高く、日射量が少ないときによく見られ、自然条件下では日の入りから日の出にかけてよく観察される⁹⁾。このとき溢泌される排水液にはリン酸、カリウムなどの無機イオンや糖、アミノ酸などの有機化合物が含まれている⁹⁾。排水液がどのような経路で排水組織に至るかについては不明な点が多いが、道管から細胞壁や細胞間隙を経て水孔に到達した液が葉の外へと排出されると考えられる。細胞からのアミノ酸放出に関わるシロイヌナズナの*GDIU*

(*Glutamine Dumper1*) の過剰発現体では排水液中のグルタミン濃度が増加し¹¹⁾, また維管束師部における細胞へのショ糖の取り込みに関わるトウモロコシの*ZmSUT1* (*SUCROSE TRANSPORTER1*) のノックアウト変異体では排水液中のショ糖濃度が増加する¹²⁾ことが知られている。これらの事実は排出液について想定される上記の経路と矛盾しない。したがって、SWEETを使ってアポプラストの糖濃度を高めることができれば、その糖を排水液によって植物体の外部に取り出すことが可能ではないかと考えた (Fig. 1A)。

上記のような仮説に基づき本研究では、17種の*AtSWEET*のすべてについて過剰発現体を作成し、それらの排水液中の糖濃度を調べた。また、イネのSWEET遺伝子 (*OsSWEET*) について同様の試みを行ったのであわせて報告する。

実験方法

SWEET 遺伝子過剰発現体の作出 *AtSWEET1* から *AtSWEET17* まで17種類の各遺伝子 (Table 1) のコード領域を人工合成した (GenScript)。人工合成遺伝子を、植物形質転換用ベクター pRI201AN (タカラバイオ) のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターの下流に挿入し、シロイヌナズナ形質転換ベクターを作製した。作製したコンストラクトを、アグロバクテリウム C58C1 株に導入し、フローラルディップ法¹³⁾により、シロイヌナズナ (Col-0) に感染させた。得られた形質転換種子を選抜培地 [30 g/L sucrose, 4.41 g/L 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 1 m/L Gamborg's vitamin solution, 50 mg/L カナマイシン, 100 mg/L カルベニシリンを含むMS培地 (大日本製薬)] で培養し、カナマイシン耐性を有するT1植物を選抜した。その後T1植物を滅菌培土 [パーミキュライト:ソイルミックス (サカタのタネ) = 1:1] を入れた6 cm ポリポットに移植し、グロースチャンバー (パナソニックヘルスケア; 22°C, 明期16時間/暗期8時間, 光量子密度 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) にて、週1回2,000倍希釈のハイボネックス液 (ハイボネックスジャパン) を施肥して育成した。本研究ではT1植物, 自家受粉したT1植物後代 (T2植物), もしくは自家受粉したT2植物後代 (T3植物) を用いた。

OsSWEET13, *14* および *15* の各遺伝子 (Table 1) のコード領域を人工合成した (GenScript)。植物用形質転換ベクター pZH2B¹⁴⁾ の、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターの下流に人工合成遺伝子を挿入し、イネ形質転換ベクターを作製した。得られたベクターを用いて Tokiら (2006) の方法¹⁵⁾ で形質転換し、形質転換カルスから再生体 (T0植物) を得た。

排水液の採取 シロイヌナズナの葉からの排水液の採取には、4から9系統のT1, T2, T3世代の過剰発現

体および対照として野生型 (WT) を用いた。ただし複数系統が取得できなかった *AtSWEET17* 遺伝子過剰発現体については、取得した2系統を用いた。イネの葉からの排水液の採取には、9系統以上の形質転換当代 (T0植物体) を用いた。イネの再分化植物体を、パーミキュライトを入れた7.5 cm ポリポットに鉢上げし、シロイヌナズナと同様に育成した。

上述のポットで育成した植物体をプラスチックバット (幅320 mm, 奥行230 mm, 深さ52 mm) に並べ、排水液を回収する前日の暗期開始前に2,000倍希釈ハイボネックス液で灌水し、湿度を高く保つためにラップフィルム (サランラップ, 旭化成ホームプロダクツ) をかけた。このときラップフィルムは、バットの四隅に15 ml のファルコンチューブ (BD falcon) を立てて固定し、その上から覆うことで、葉から出た排水液がラップフィルムに付着しないよう注意した。翌朝ラップフィルムを外し、葉の縁に生じた排水液を速やかにマイクロピペットにより回収した。この方法 (ラップ法) により、シロイヌナズナの各個体から50~100 μL の排水液を採取したが、*AtSWEET12* 過剰発現体は矮小な表現型を示したため、採取できる排水液の量は20 μL 程度であった。また、イネからは10 μL 程度の排水液を採取した。排水液の採取には、播種から25日前後 (最短でも鉢上げ後5日目以降) の抽だい前の植物体を用いた。ただし、*AtSWEET12* の過剰発現体は生育が遅延したため45~55日目の植物体を用いた (後述)。

***AtSWEET* の mRNA レベルの解析** *AtSWEET* 過剰発現体およびWT個体のロゼット葉をサンプリングし、RNeasy Plant Mini kit (キアゲン) を使って抽出した total RNA (各1 μg) から、PrimeScriptTM RT reagent Kit (タカラバイオ) を用いてcDNAを合成した。これを鋳型とし (一反応につき total RNA 100 ng相当), *AtSWEET* 特異的プライマー (Table 1) と ExTaq (タカラバイオ) を用いて半定量PCRを行った (25サイクル)。なお内部コントロールとしては *ACT8* 遺伝子 (*At1g49240*) を用いた。プライマーペアは、イントロンを持たない *AtSWEET6* 以外は、イントロンをまたぐように設計し、cDNAからの増幅産物とゲノムDNAの増幅産物が識別できるようにした。

排水液中の可溶性糖濃度の測定 排水液中の可溶性糖濃度 (主に単糖および二糖) はパルスドアンペロメトリ検出器を装着した高速液体クロマトグラフ (Dionex ICS-5000⁺, カラム: CarboPac PA1, 溶離液: 100 mM NaOH) により分析した。

全葉糖分析 排水液を採取したロゼット葉を切り取り、ただちに液体窒素で凍結した後、冷凍保存した。全葉を液体窒素中で粉碎し、岡村ら¹⁶⁾の方法に従って可溶性糖類およびデンプンを抽出した後、F-kit (ジェイ・

Table 1. Locus No. of Arabidopsis and rice SWEET genes and the primers used for RT-PCR

Clade	Gene name	Locus No.	Primer name	Origin	Nucleotide sequence (5'-3')	size (bp)
I	<i>AtSWEET1</i>	At1g21460	AtSW1-8F	<i>A. thaliana</i>	TCGCTCACACTATCTTCG	466
			AtSW1-473R		ACACTCTTCGTCTTTACC	
	<i>AtSWEET2</i>	At3g14770	AtSW2-20F	<i>A. thaliana</i>	TGCTTCTTTATCCATGTG	594
			AtSW2-613R		TTCCTATTCCATTTGGTG	
	<i>AtSWEET3</i>	At5g53190	AtSW3-39F	<i>A. thaliana</i>	AACGGAGCTTCTCTGTTG	562
			AtSW3-600R		AGTCGCAACCATATTAGG	
II	<i>AtSWEET4</i>	At5g53190	AtSW4-118F	<i>A. thaliana</i>	AGGAGTACAAAGCTGACC	500
			AtSW4-617R		TGTA CTGCTCCTGATA CC	
	<i>AtSWEET5 (VEX1)</i>	At5g62850	AtSW5-132F	<i>A. thaliana</i>	AGATCCATACGTAGCTAC	544
			AtSW5-675R		TCTTCATCGTCATCGTTC	
	<i>AtSWEET6</i>	At1g66770	AtSW6-203F	<i>A. thaliana</i>	ATCCTGATAGCACCTTGC	484
			AtSW6-686R		ACCAACGTAACCGAGTCG	
	<i>AtSWEET7</i>	At4g10850	AtSW7-69F	<i>A. thaliana</i>	TCTGTTCTTGTCACCAAC	659
			AtSW7-727R		TACGAGCGATCGCACTTG	
	<i>AtSWEET8 (RPG1)</i>	At5g40260	AtSW8-53F	<i>A. thaliana</i>	TCTCCTTTGGTCTCTTTG	558
			AtSW8-610R		AGGTTCCAATCCCATTAC	
III	<i>AtSWEET9</i>	At2g39060	AtSW9-137F	<i>A. thaliana</i>	TACCGTACATATGTGCAC	546
			AtSW9-682R		TTGCTAGTTGGTTCTCTG	
	<i>AtSWEET10</i>	At5g50790	AtSW10-167F	<i>A. thaliana</i>	TGCTATGGATGTACTACG	565
			AtSW10-731R		ACCATCGTACTTAGCCTC	
	<i>AtSWEET11</i>	At3g48740	AtSW11-184F	<i>A. thaliana</i>	TACTATGCGACACAGAAG	545
			AtSW11-728R		AGCTTCAACATATCGAGG	
	<i>AtSWEET12</i>	At5g23660	AtSW12-172F	<i>A. thaliana</i>	TGCTTTGGCTCTACTACG	576
			AtSW12-747R		AGGAGATGTGAGTGTACC	
	<i>AtSWEET13 (RPG2)</i>	At5g50800	AtSW13-238F	<i>A. thaliana</i>	TGCGTCATCGAAACCATC	558
			AtSW13-795R		AGTCTCGGGAACATTGTG	
	<i>AtSWEET14</i>	At4g25010	AtSW14-226F	<i>A. thaliana</i>	AACGCTGTGGGATGCTTC	564
			AtSW14-789R		AGGATGACTCACGTCAGG	
	<i>AtSWEET15</i>	At5g13170	AtSW15-72F	<i>A. thaliana</i>	TGTATTCCTCGCTCCAGT	510
			AtSW15-581R		ATGCATATGTCATTGAGG	
	IV	<i>AtSWEET16</i>	At3g16690	AtSW16-100F	<i>A. thaliana</i>	AGATCGACGGAGGAATAC
AtSW16-653R				TCTTCTACAATTGGTTTCG		
<i>AtSWEET17</i>		At4g15920	AtSW17-90F	<i>A. thaliana</i>	AGTGAAGCGGAGATCAAC	594
			AtSW17-683R		TCATCTTGAGCAATCTCAC	
—	<i>ACT8</i>	At1g49240	ACT8-8F	<i>A. thaliana</i>	TGCTGATGACATTCAACC	520
			ACT8-527R		ACGGAGGATAGCATGTGG	
III	<i>OsSWEET13</i>	Os12g0476200	—	<i>O. sativa</i>	—	—
	<i>OsSWEET14 (OsIIN3)</i>	Os11g0508600	—	<i>O. sativa</i>	—	—
	<i>OsSWEET15</i>	Os02g0513100	—	<i>O. sativa</i>	—	—

ケイ・インターナショナル) を用いてショ糖, グルコース, フルクトース, およびデンプンを定量した。

統計解析 統計解析はR (ver 3.3.2)¹⁷⁾を用いて行った。正規性の検討は, Shapiro-Wilk検定により行った。シロイヌナズナとイネの排水液中の可溶性糖濃度, およびシロイヌナズナの全葉糖濃度は, 正規分布に従わなかったため, ノンパラメトリック (Kruskal-Wallis) 検定を採用し, WTとSWEET過剰発現体間で多群検定を行った。有意差がみられた場合, WTと各SWEET過剰発現体間でMann-WhitneyのU検定 (Bonferroni補正つき) を行った。

実験結果

AtSWEET過剰発現シロイヌナズナの生育 CaMV 35Sプロモーター制御下に全17種類のAtSWEETそれぞれを過剰発現させるシロイヌナズナ形質転換体を作出した。半定量RT-PCR分析の結果, これらの形質転換体では, いずれも導入したAtSWEETのmRNAレベルが野生型個体よりも高かった (Fig. 2A)。また, これらの形質転換体の生育は, AtSWEET12過剰発現体が顕著な生育阻害を示した他, AtSWEET11, 13, 14の過剰発現体でも若干の生育阻害が見られた。その他の系統では対照系統に対して明瞭な差異は見られなかった (Fig. 2B)。また, AtSWEET12過剰発現体は矮小なばかりでなく, 抽だい時期が50~60日 (その他の系統は30日程度) であり, 生育の遅延が顕著であった。

ラップ法による排水液の採取 本研究で用いたグロースチャンバーのように湿度制御ができない人工気象器や温室内では, 分析に十分な量の排水液を採取することが難しい。この問題の解決策として, 根圧を高めるた

めにハイポネックス液で灌水し, 蒸散を抑えるために植物体をラップフィルムで覆って一晩静置した (ラップ法)。その結果, 翌朝にはシロイヌナズナの葉の裏側に複数の水滴 (排水液) が確認され (Fig. 1B), 生じた水滴を速やかにマイクロピペットで吸い取ることによって, HPLCによる糖分析には十分な量 (10~100 μ L) を回収することができた。

AtSWEET過剰発現シロイヌナズナの排水液糖濃度

ラップ法を用いて採取した野生型シロイヌナズナの葉からの排水液には, 可溶性糖としてショ糖, グルコースおよびフルクトースが含まれ, その総量は単糖に換算して $3.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$ であった (Fig. 3)。また, それら以外の糖はほとんど検出されなかった。一方, CaMV 35Sプロモーター制御下でAtSWEETを過剰発現させた場合は, AtSWEET7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15の過剰発現体において排水液中のショ糖, グルコース, フルクトース濃度がいずれも有意に上昇した。また, AtSWEET5過剰発現体ではグルコース濃度とフルクトース濃度が, AtSWEET4およびAtSWEET8の過剰発現体ではフルクトース濃度がそれぞれ有意に上昇した。これらのうち, AtSWEET12過剰発現体では可溶性糖濃度が特に高く, 平均でショ糖 $2.7 \pm 0.7 \text{ mM}$, グルコース $2.2 \pm 0.3 \text{ mM}$, フルクトース $2.7 \pm 0.4 \text{ mM}$, これらの合計では $10.2 \pm 2.0 \text{ mM}$ (単糖換算) と野生型個体の3,000倍を超える高濃度であった。

AtSWEET過剰発現体の葉中糖・デンプン含量

AtSWEET過剰発現体のロゼット葉中の糖含量を測定した結果, いずれの過剰発現体においてもショ糖, グルコース, フルクトースおよびデンプン含量に野生型個体との間に有意な差は見られなかった (Table 2)。

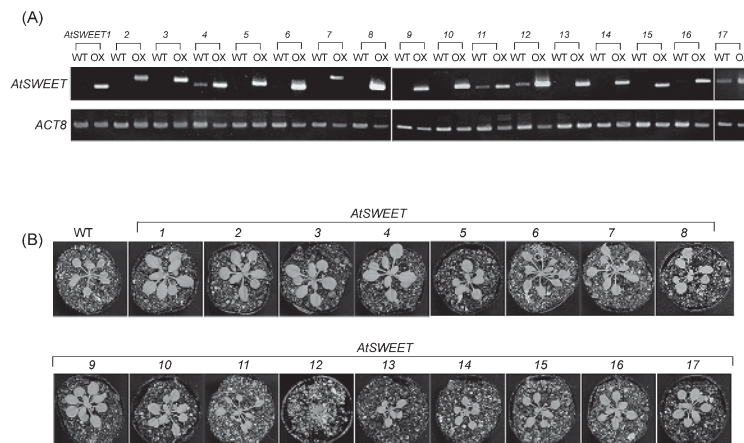


Fig. 2. *AtSWEET*-overexpressed *Arabidopsis* plants that produced in this study. (A) The agarose gel images resulting from the semi-quantitative RT-PCR analyses of each *AtSWEET*-overexpressed (OX) line in comparison with the wild type (WT) plants. Total RNA was isolated from the rosette leaves and then subjected to RT-PCR analyses with specific primers for individual *AtSWEET* or *ACT8* as a reference gene. (B) The phenotypes of the wild-type (WT) and *AtSWEET*-overexpressed *Arabidopsis* plants. All the plants shown are 28-days old, except for the *AtSWEET12*-overexpressed *Arabidopsis*, which is 53-day old.

OsSWEET過剰発現イネの排水液糖濃度 シロイヌナズナでは*AtSWEET12*をはじめとするCladeIII型の*AtSWEET*を過剰発現させた場合に特に顕著に排水液中の糖濃度が上昇した。そこで、イネにおいてもCladeIII型SWEETの過剰発現によって排水液中の糖濃度が上昇するか調べるために、分子進化系統樹上で*AtSWEET12*と近縁な*OsSWEET12*, *13*, *15*¹⁾を過剰発現させたイネ形質転換体を作成した。それらの葉からの排水液中の糖濃度を調べた結果、可溶性糖の組成はショ糖、グルコース、フルクトースがほとんどで、それらを合計した糖濃度はいずれの過剰発現イネでも野生型と比較して有意に高かった(Fig. 4)。特に*OsSWEET13*過剰発現体ではショ糖、グルコース、フルクトースの平均濃度がそれぞれ 22.7 ± 6.0 mM, 62.4 ± 10.0 mM, 77.9 ± 13.1 mMで、野生型(各 0.08 ± 0.05 μ M, 2.9 ± 1.2 μ M, 2.9 ± 1.2 μ M)に比べてきわめて高かった。

考 察

本研究ではSWEET遺伝子をシロイヌナズナおよびイネで過剰発現した植物体から、ラップ法を用いて葉から人為的に排水液を取り出し、その糖濃度(ショ糖、グルコース、フルクトース)を評価した。シロイヌナズナで

はSWEETをコードする17種類すべての遺伝子について過剰発現体を作成し、RT-PCRによって導入遺伝子が葉で過剰発現していることを確認した(Fig. 2)。そして、そのうち11種類で排水液中の何らかの糖濃度上昇が認められた(Fig. 3)。シロイヌナズナのSWEETは分子進化系統樹上でI~IVのCladeに分かれるが¹⁾、今回の実験ではCladeIII型に属するSWEET遺伝子の過剰発現体で、排水液中の糖濃度が特に高かった。CladeIII型SWEETの過剰発現が排水液中の糖濃度を高める効果はイネでも確認できた(Fig. 4)。一方、CladeIの*AtSWEET1*, 2および3の過剰発現ではいずれもWTと比較して糖濃度の上昇は見られず、CladeIIの*AtSWEET*過剰発現では一部に糖濃度を高めるものが見られたが、その効果はCladeIIIの遺伝子に比べて非常に小さかった(Fig. 3)。このように、排水液中の糖濃度上昇には導入遺伝子の種類による明らかな違いがあったが、葉中の糖濃度はいずれの過剰発現体においてもWTと比較して差は見られなかった(Table 2)。したがって、排水液中の糖濃度の増加は、アポプラストにおける糖濃度の増加、すなわちSWEET遺伝子の過剰発現にともなう細胞内外の糖の分配の変化によると考えられた。こうしたことから、*AtSWEET12*過剰発現体で見られた顕著な生育阻害の要

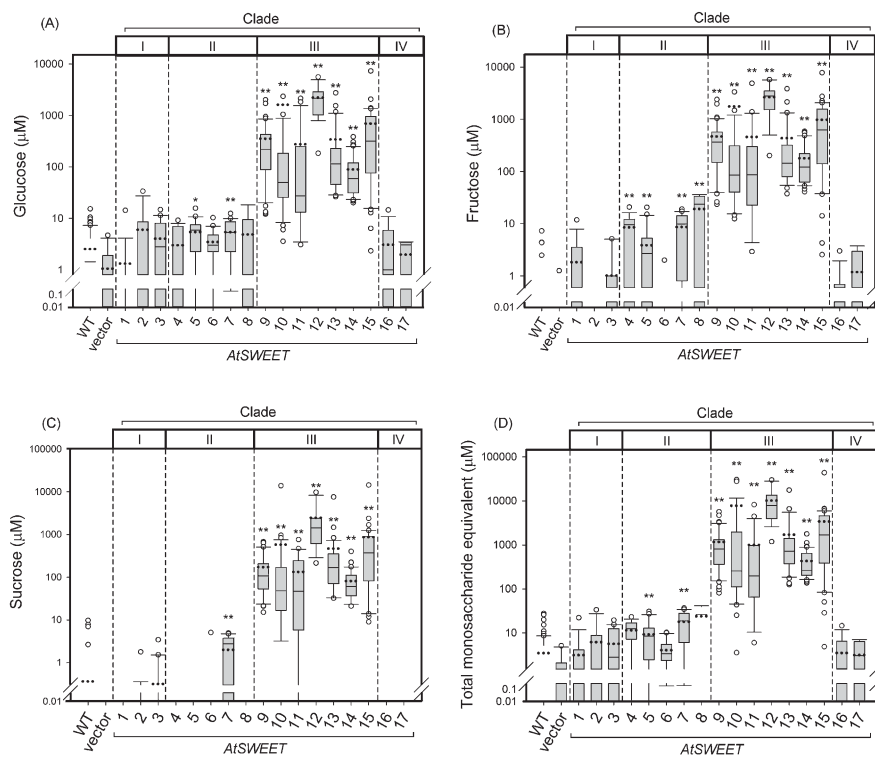


Fig. 3. Soluble sugar concentrations of the guttation fluids exuded from the leaves of transgenic Arabidopsis overexpressing one of the 17 *AtSWEETs* (*AtSWEET1* to 17), and harboring the empty vector (vector) and non-transgenic Arabidopsis (WT). (A) - glucose, (B) - fructose, (C) - sucrose, and (D) - the sum of A, B, and C (total sugars; monosaccharide equivalent). Dotted lines in the graphs show the average. Asterisks represent significant differences from WT as estimated by the Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction. *; $P < 0.005$; **; $P < 0.001$.

Table 2. Soluble sugar and starch concentrations in the leaves of transgenic Arabidopsis overexpressing one of the 17 *AtSWEET*s (*AtSWEET1* to *17*) and non-transgenic Arabidopsis (wild type).

Clade	Transgene	N	Sucrose (mg/gFW)		Glucose (mg/gFW)		Fructose (mg/gFW)		Sugars (mg/gFW)		Starch (mg/gFW)	
			Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD
I	<i>AtSWEET1</i>	5	0.28	0.20	0.49	0.17	0.22	0.03	0.98	0.17	2.81	1.88
	<i>AtSWEET2</i>	5	0.39	0.25	0.41	0.23	0.19	0.03	0.99	0.11	2.32	1.60
	<i>AtSWEET3</i>	5	0.33	0.10	0.48	0.12	0.22	0.07	1.03	0.09	2.51	1.52
II	<i>AtSWEET4</i>	5	0.43	0.19	0.56	0.21	0.22	0.02	1.21	0.11	2.81	2.26
	<i>AtSWEET5</i>	5	0.54	0.27	0.58	0.10	0.22	0.05	1.34	0.30	2.93	1.93
	<i>AtSWEET6</i>	3	0.40	0.37	0.91	0.80	0.42	0.17	1.74	0.79	1.69	0.99
	<i>AtSWEET7</i>	3	0.29	0.16	0.75	0.23	0.28	0.06	1.31	0.20	1.83	1.12
	<i>AtSWEET8</i>	3	0.56	0.27	0.55	0.42	0.43	0.14	1.54	0.78	2.91	1.79
III	<i>AtSWEET9</i>	5	0.48	0.49	0.66	0.25	0.42	0.13	1.56	0.25	1.91	1.17
	<i>AtSWEET10</i>	5	0.68	0.37	0.46	0.24	0.32	0.05	1.46	0.12	2.38	1.75
	<i>AtSWEET11</i>	5	0.49	0.28	0.39	0.24	0.42	0.19	1.30	0.14	0.49	0.37
	<i>AtSWEET13</i>	5	0.86	0.53	0.50	0.32	0.16	0.03	1.52	0.41	2.05	2.08
	<i>AtSWEET14</i>	5	0.71	0.36	0.31	0.23	0.31	0.23	1.33	0.36	0.34	0.47
	<i>AtSWEET15</i>	4	0.31	0.19	0.51	0.13	0.35	0.15	1.17	0.21	0.46	0.44
IV	<i>AtSWEET16</i>	5	0.54	0.27	0.69	0.11	0.25	0.11	1.49	0.29	1.65	1.77
	<i>AtSWEET17</i>	5	0.31	0.18	0.62	0.14	0.30	0.12	1.23	0.19	1.83	1.86
	WT	3	0.42	0.22	0.66	0.13	0.44	0.07	1.53	0.17	1.09	1.12

For each *AtSWEET*, one of the overexpression lines was selected for this analysis. The rosette leaves were sampled from three to five plants (N), and the concentrations of soluble sugars (sucrose, glucose and fructose) and starch in the leaf samples were estimated on the basis of fresh weight. Data on *AtSWEET12*-overexpressor were not determined as the rosette leaves were too small to obtain reliable data.

因として、細胞内外の糖分配が大きく変化して葉の細胞内で必要な、もしくは他器官に転流されるべき糖が不足した可能性が考えられた。

これまでSWEETの糖輸送活性は、ヒト胎児腎細胞を用いたFRET糖センサーや、アフリカツメガエル卵母細胞や酵母を用いた糖輸送実験によって調べられてきた^{1,2,5)}。これらにより、CladeIIIの*AtSWEET11*, *12*および*14*についてはシヨ糖輸送活性を持つことが示されている⁵⁾。また、変異体の解析からCladeIIIの*AtSWEET9*が蜜腺におけるシヨ糖の放出に寄与することが示唆されている⁴⁾。本研究の結果はこれらの知見と矛盾しない、また、同種発現系ですべてのCladeIII型*AtSWEET*がシヨ糖輸送能を持つことを示唆した初の報告である。なお、シヨ糖輸送体として知られるCladeIII型*AtSWEET*の過剰発現体の排水液では、シヨ糖ばかりでなくグルコースやフルクトースの濃度も上昇していた (Fig. 3)。これらは、細胞外に排出されたシヨ糖が細胞壁に存在するインベルターゼにより分解された可能性がある。一方、*AtSWEET1*, *5*および*8*はいずれも原形質膜に局在し、グルコース運搬能力を持つことが報告されている^{1,3)}。本研究ではこれら遺伝子の過剰発現体からの排水液中の

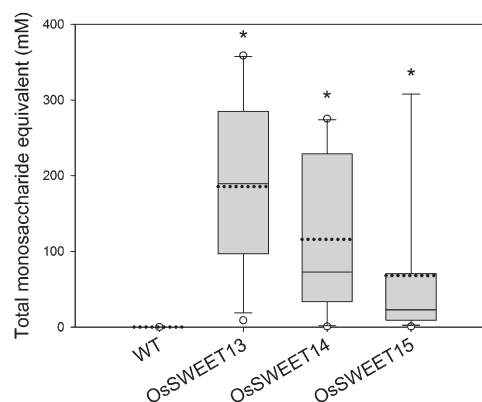


Fig. 4. Total sugar concentrations of the guttation fluids exuded from the leaves of the Clade III *OsSWEET*-overexpressed (*OsSWEET13*, *14*, and *15*) and non-transgenic (WT) rice plants. Dotted lines in the graphs show the average. Asterisks represent significant differences ($P < 0.005$) from WT as estimated by the Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction.

グルコース濃度に変化はなかったが、この原因は不明である (Fig. 3)。

最後に本研究の成果について、実用技術としての今後

の可能性を考えたい。本研究で作出したCladeIII型 *OsSWEET* 過剰発現イネの排水液中可溶性糖濃度は、単糖換算の平均で185 mMであった。一般的なサトウキビの搾汁中の糖濃度は15%前後¹⁸⁾、その大半はショ糖が占めるので、すべてショ糖であると仮定するならば単糖換算では約877 mMとなる。すなわち今回の *OsSWEET* 過剰発現により、サトウキビ搾汁の1/5程度の糖濃度の排水液を非破壊で取り出すことができた。一方、本技術の特色として糖料作物のような糖蓄積性がなくとも、糖合成能力があれば種を問わずさまざまな植物から糖を取り出すことができる点がある。したがって、使用する植物種をさらに検討することで、より高濃度の糖液を得ることができるかもしれない。加えて、本技術のもう一つの特色である排水液についても、環境条件を整えることで容易に採取できることがわかった。本研究で考案したラップ法は、灌水とともに無機イオンを供与して根の水分吸収を促進し根圧を高めるとともに、植物体をラップで覆って蒸散量を減らし排水液が出やすい条件を整えたもので、さまざまな植物種に適用可能と思われる。したがって、今後は糖の合成能力や排水液採取の効率性、栽培コストなども加味してより好適な植物種を検討する必要がある。一方、多くの植物は根から根圏に糖を放出することから²⁾、これを糖の取り出し方法として利用することもできるかもしれない。ただし、この場合は植物を無菌的に液耕する必要があるほか、培養液中の糖を濃縮する手間やコストも考慮せねばならず、排水液を用いる本法との優劣は今後検討すべき課題である。

要 約

バイオ製品のコストダウンにつながる技術を開発するため、生きた植物から光合成の主産物である糖類を、非破壊で取り出すことを試みた。方法として、1) 糖輸送体SWEETを用いて葉の細胞内から細胞外(アポプラスト)へ糖を放出させるとともに、2) その糖を排水液により植物体外に取り出すことを考えた。

シロイヌナズナのゲノムには17種類のSWEET遺伝子(*AtSWEET*)が存在する。そこでそれらすべてについて過剰発現体を作成し、排水液中の糖濃度を測定したところ、CladeIII型に分類される一群の*AtSWEET*の過剰発現体で、顕著に排水液中の糖濃度が増加した。中でも*AtSWEET12*過剰発現体の排水液は、もっとも高い糖濃度を示し、単糖換算で平均 10.2 ± 2.0 mMの糖濃度を示した(野生型では 3.1 ± 0.6 μ M)。さらにCladeIII型のイネSWEET遺伝子(*OsSWEET13*)をイネで過剰発現させると、単糖換算で平均 185.6 ± 32.8 mMの糖濃度の排水液が得られた(野生型では 4.9 ± 2.1 μ M)。結論として、SWEETの過剰発現と排水液の利用により、生きた植物から非破壊で糖を取り出すことが可能である

ことが示された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、実験にご協力いただいた高津戸貴以子氏、寺田久美氏、伊藤治美氏、鈴木しをり氏に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Chen, L. Q., Hou, B. H., Lalonde, S., Takanaga, H., Hartung, M. L., Qu, X. Q., Guo, W. J., Kim, J. G., Underwood, W., Chaudhuri, B., Chermak, D., Antony, G., White, F. F., Somerville, S. C., Mudgett, M. B., and Frommer, W. B.: *Nature*, **468**, 527–532 (2010).
- 2) Chen, H. Y., Huh, J. H., Yu, Y. C., Ho, L. H., Chen, L. Q., Tholl, D., Frommer, W. B., and Guo, W. J.: *Plant J.*, **83**, 1046–1058 (2015).
- 3) Guan, Y. F., Huang, X. Y., Zhu, J., Gao, J. F., Zhang, H. X., and Yang, Z. N.: *Plant Physiol.*, **147**, 852–863 (2008).
- 4) Lin, I. W., Sosso, D., Chen, L. Q., Gase, K., Kim, S. G., Kessler, D., Klinkenberg, P. M., Gorder, M. K., Hou, B. H., Qu, X. Q., Carter, C. J., Baldwin, I. T., and Frommer, W. B.: *Nature*, **508**, 546–549 (2014).
- 5) Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., and Frommer, W. B.: *Science*, **335**, 207–211 (2012).
- 6) Chardon, F., Bedu, M., Calenge, F., Klemens, P. A., Spinner, L., Clement, G., Chietera, G., L eran, S., Ferrand, M., Lacombe, B., Loudet, O., Dinant, S., Bellini, C., Neuhaus, H. E., Daniel-Vedele, F., and Krapp, A.: *Curr. Biol.*, **23**, 697–702 (2013).
- 7) Liu, X., Zhang, Y., Yang, C., Tian, Z., and Li, J.: *Sci. Rep.*, **6**, 24563 (2016).
- 8) Seo, P. J., Park, J. M., Kang, S. K., Kim, S. G., and Park, C. M.: *Planta*, **233**, 189–200 (2011).
- 9) Singh, S.: *Aust. J. Bot.*, **61**, 497–515 (2013).
- 10) Maeda, E. and Maeda, K.: *Jpn. J. Crop Sci.*, **57**, 733–742 (1988).
- 11) Pilot, G., Stransky, H., Bushey, D. F., Pratelli, R., Ludewig, U., Wingate, V. P., and Frommer, W. B.: *Plant Cell*, **16**, 1827–1840 (2004).
- 12) Slewinski, T. L., Garg, A., Johal, G. S., and Braun, D. M.: *Plant Signal. Behav.*, **5**, 687–690 (2010).
- 13) Clough, S. J. and Bent, A. F.: *Plant J.*, **16**, 735–743 (1998).
- 14) Kuroda, M., Kimizu, M., and Mikami, C.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2348–2351 (2010).
- 15) Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S., and Tanaka, H.: *Plant J.*, **47**, 969–976 (2006).
- 16) Okamura, M., Hashida, Y., Hirose, T., Ohsugi, R., and Aoki, N.: *Plant Prod. Sci.*, **19**, 309–314 (2016).
- 17) R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. <https://www.R-project.org/> (2017/8/3)
- 18) 公益社団法人 沖縄県糖業振興協会：平成25年産さとうきび品質・生産実績(平成26年7月)