

# アスパラガス収穫期の養分消費を担うフルクタン加水分解酵素

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	上野,敬司 園田,高広 吉田,みどり 川上,顕 塩見,徳夫 小野寺,秀一
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	12巻2号
掲載ページ	p. 117-122
発行年月	2022年5月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat





応用糖質科学シンポジウム

# Fructan Exohydrolase Involved in Fructan Consumption during the Asparagus Harvest\*

## アスパラガス収穫期の養分消費を担うフルクタン加水分解酵素\*

上野敬司<sup>1,\*</sup>, 園田高広<sup>1</sup>, 吉田みどり<sup>2</sup>, 川上 顕<sup>2</sup>,  
塩見徳夫<sup>1</sup>, 小野寺秀一<sup>1</sup>

(うえの けいじ, そのだ たかひろ, よしだ みどり, かわかみ あきら,  
しおみ のりお, おのでら しゅういち)

Keiji Ueno,<sup>1,\*</sup> Takahiro Sonoda,<sup>1</sup> Midori Yoshida,<sup>2</sup> Akira Kawakami,<sup>2</sup>  
Norio Shiomi,<sup>1</sup> and Shuichi Onodera<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 酪農学園大学大学院酪農学研究科  
069-8501 北海道江別市文京台緑町 582

<sup>2</sup> 農研機構北海道農業研究センター  
062-8555 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 1

<sup>1</sup> Graduate School of Dairy Science, Rakuno Gakuen University  
582 Bunkyo-dai Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

<sup>2</sup> NARO Hokkaido Agricultural Research Center,  
1 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo, Hokkaido 062-8555, Japan

**要旨:** アスパラガス地下部の貯蔵根にはスクロースにフルクトースが結合したフルクタンを蓄積している。アスパラガスのフルクタンは、可食部である若茎の萌芽、伸長のための養分であり、若茎の収穫期に減少する。この養分消費を担うフルクタン加水分解酵素 (FEH) の詳細を明らかにすることを試みた。植物の FEH は他植物においてイヌリン型フルクタンを分解する 1-FEH, レバン型を分解する 6-FEH, その両方を分解する 6&1-FEH が報告されていた。アスパラガス貯蔵根から精製した FEH 及びその酵素遺伝子 *aoeh4* から *Pichia pastoris* を用いて作製した組換えタンパク質は 1-FEH 活性を有するとともに、本来 1-FEH が持ち合わせていないイヌリンネオ型フルクタンのグルコースとフルクトースの  $\beta$ -2,6 結合を主に加水分解した。また、アスパラガス若茎の収穫が進み、貯蔵根のフルクタン含量が減少するとともに *aoeh4* 遺伝子発現が上昇し、イヌリンネオ型フルクタンの加水分解活性が増加することから本酵素及び *aoeh4* 遺伝子がアスパラガス収穫期のフルクタン消費に関与することが明らかとなった。

**キーワード:** フルクタン, フルクトオリゴ糖, フルクタン加水分解酵素, アスパラガス\*\*\*

### 1. はじめに

多くの植物は光合成同化産物を澱粉の形態で貯蔵するが、一部の植物 (被子植物の 15% と言われる<sup>1)</sup>) ではフルクトース (Fru) の重合体であるフルクタンを貯蔵し利用する。このフルクタンは植物種により蓄積する構造が異なる (図 1)。キクイモ、チコリー、ゴボウなどの双子葉植物ではスクロース (Suc) の Fru に Fru が  $\beta$ -2,1 結合し、直鎖状に伸長した構造のイヌリン型フルクタンを蓄積する<sup>2,3)</sup>。このイヌリン型フルクタンの三糖類の 1-ケストース (1K)

や四糖類のニストース (Nys) はプレバイオティクス作用を示し特定保健用食品素材として利用されている<sup>6,7)</sup>。一方、単子葉植物のうち、小麦や大麦などでは Suc の Fru に Fru が  $\beta$ -2,6 結合し、直鎖状に伸長した構造のレバン型フルクタンや  $\beta$ -2,6 結合と  $\beta$ -2,1 結合の両方の結合様式で分岐した構造を持つグラミン型フルクタンを主に蓄積する<sup>8,9)</sup>。レバン型フルクタンの三糖類が 6-ケストース (6K) である。アスパラガスやタマネギではイヌリン型フルクタンのグルコース (Glc) の 6 位炭素の水酸基に Fru が  $\beta$ -2,6 結合し、さらにその Fru に Fru が  $\beta$ -2,1 結合した構造のイ

\* 本原稿は、日本応用糖質科学会 2021 年度大会応用糖質科学シンポジウムで一部発表された。

\*\* 連絡先 (Tel. 011-388-4715, E-mail: ueno-k@rakuno.ac.jp)

\*\*\* Key words: fructan, fructooligosaccharides, fructan exohydrolase, asparagus

略記: Glc, グルコース; Fru, フルクトース; Suc, スクロース; 1K, 1-ケストース; Nys, ニストース; F-Nys, フルクトシルニストース; 6K, 6-ケストース; NK, ネオケストース; 4c, 1<sup>f</sup>, 6<sup>e</sup>-di- $\beta$ -D-fructofuranosylsucrose; 4b, 6<sup>e</sup> (1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose; FEH, fructan exohydrolase; 1-FEH, fructan 1-exohydrolase; 6-FEH, fructan 6-exohydrolase; 6&1-FEH, fructan 6&1-exohydrolase.

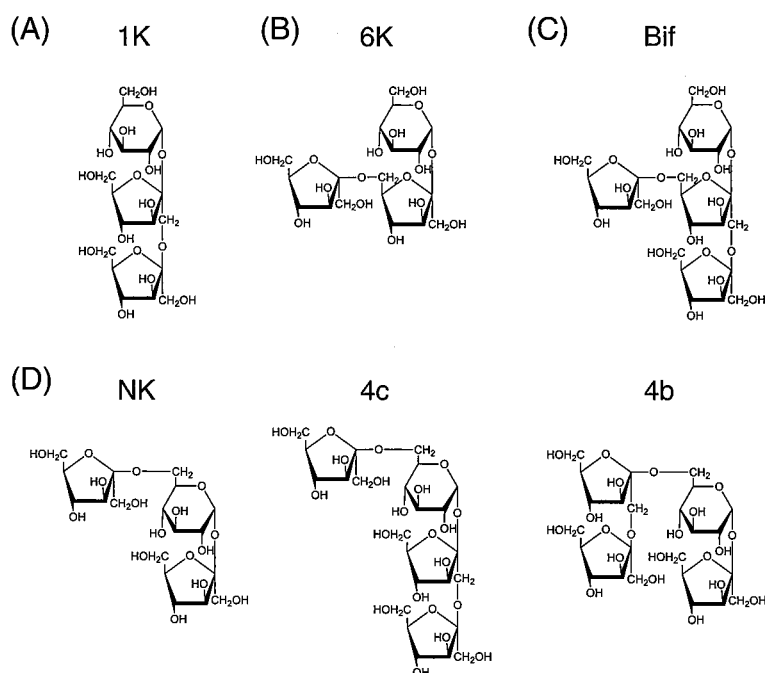


図1. 植物に含まれる各種フルクトンの構造の例

(A) イヌリン型フルクトンの三糖類の1-ケストース (1K), (B) レバン型フルクトンの三糖類の6-ケストース (6K), (C) グラミナン型フルクトンの四糖類のピフルコース (Bif), (D) イヌリンネオ型フルクトンの三糖類のネオケストース (NK) と四糖類の1<sup>f</sup>, 6<sup>g</sup>-di-β-D-fructofuranosylsucrose (4c), 6<sup>g</sup> (1-β-D-fructofuranosyl) sucrose (4b).

ヌリンネオ型フルクトンを主に蓄積する<sup>10,11)</sup>.

アスパラガスはキジカクシ科サスギズラ属の多年生植物で、耐寒性・耐暑性・耐塩性も強く、多様な気候帯で栽培することが可能で、日本では北海道から沖縄まで広く栽培されている<sup>12)</sup>。アスパラガスでは地下部の貯蔵根にイヌリン型及びイヌリンネオ型フルクトンが蓄積しており、可食部である若茎が萌芽、伸長する収穫期に貯蔵根のフルクトンが減少することから、貯蔵されたフルクトンは、萌芽および伸長のエネルギーのための養分と考えられている<sup>13,14)</sup>。

植物のフルクトンの加水分解酵素は fructan exohydrolase (FEH) と呼ばれ、フルクトンの末端の Fru 残基を遊離する exo 型のフルクタンナーゼで、Suc には作用しない酵素であり、glycoside hydrolase family 32 (GH32) に属している。GH32 には Suc を分解するインベルターゼが属しており、インベルターゼと FEH の共通した触媒残基を含む保存領域が含まれる<sup>15)</sup>。アミノ酸配列の相同性からフルクトン分解に関わる FEH は細胞壁型インベルターゼから、フルクトン合成に関わる fructosyltransferase は液胞型インベルターゼから進化したと考えられている<sup>16,17)</sup>。植物 FEH は作用するフルクトンの種類により、3 種の FEH が知られており、フルクトン鎖の末端 β-2,1 結合した Fru 残基を遊離する fructan 1-exohydrolase (1-FEH)<sup>18-20)</sup>、末端 β-2,6 結合した Fru 残基を遊離する fructan 6-exohydrolase (6-FEH)<sup>21,22)</sup> 及びその両方に作用する fructan 6&1-exohydrolase (6&1-FEH)<sup>23)</sup> が各種の植物から同定されている。イヌリンネオ型フルクトンを蓄積するアスパラガスにおいてはその詳細は知られていなかったが、我々はアスパラガス FEH につい

て他の FEH とは異なるユニークな特徴を有することを明らかにした<sup>24)</sup>。

本稿では、最近、見出したアスパラガス収穫期の貯蔵根のフルクトンの消費に関与する酵素について紹介する。

## 2. アスパラガスのフルクトン加水分解酵素 6G&1-FEH<sup>24)</sup>の発見

### 2.1 アスパラガスの貯蔵根フルクトン含量

アスパラガス FEH の探索に必要なアスパラガス貯蔵根の採取のため、従来のアスパラガスの栽培方法 (露地栽培、ハウス半促成栽培) とは異なる伏せ込み促成栽培と呼ばれる作型を用いた。この作型はアスパラガスを露地で1~2年間養成し、十分に根株の貯蔵根にフルクトンを蓄積させた秋冬期に、土から掘り上げ、パイプハウス内の電熱温床に伏せ込み、加温して収穫する栽培方法である<sup>25,26)</sup>。本作型では、圃場から一度、アスパラガス地下部を掘り上げるため、アスパラガス若茎収穫中の貯蔵根採取がしやすい。我々は、この作型でアスパラガスの収量性や萌芽の早晚が異なり収穫開始日が異なる7品種を栽培し、掘り上げ時 (収穫前) と収穫開始から約2か月後 (収穫終了後) の貯蔵根のフルクトンとフルクトオリゴ糖分解活性を調べた。伏せ込み促成栽培用品種は紫アスパラガスや露地栽培用品種より収穫開始日が早く、収量も高い傾向にあるが、収穫前のフルクトン含量はいずれも同程度であった<sup>27)</sup>。収穫終了後では伏せ込み促成栽培用品種では他の品種と比べてフルクトオリゴ糖分解活性が高く、フルクトン含量が低

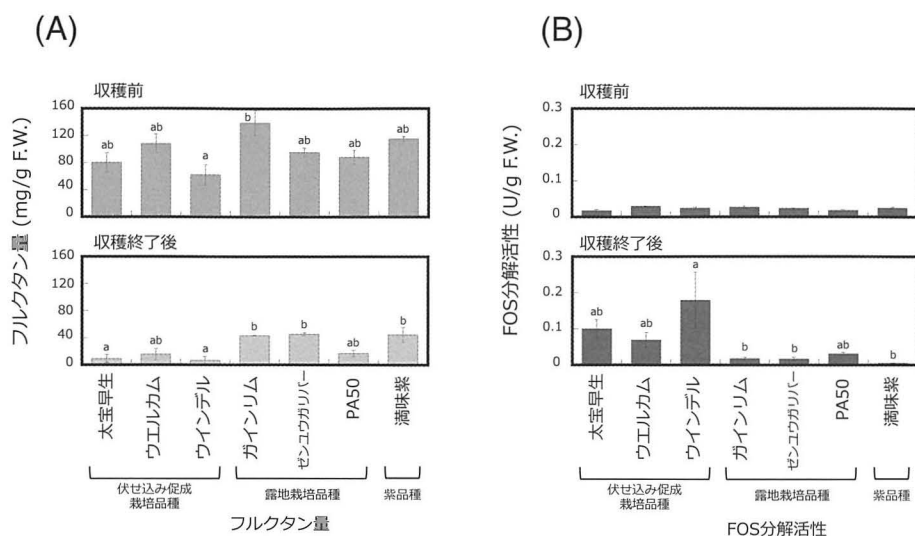


図2. アスパラガス取穫前後の貯蔵根のフルクタン含量とフルクトオリゴ糖分解活性

各アスパラガス品種の取穫前後の貯蔵根を試料とした。フルクタン量 (A) は、貯蔵根から抽出した糖溶液をフルクタンナーゼ処理を行い、反応液中のグルコース、フルクトース量を HPAEC で分析し、算出した。フルクトオリゴ糖 (FOS) 分解活性 (B) は、市販 FOS (1-kestose, ニストースの混合物) を基質として貯蔵根から調製した粗酵素液を反応させ、反応生成物中のフルクトース量から算出した。1 分間に 1  $\mu$ mol の Fru を生成する酵素量を 1 U とした。グラフ中の異なるアルファベットは 5% 水準での有意差を表す (文献 27) から改変転載)。

かった。他の品種ではフルクタンが残存する傾向を示した (図 2)。このことからフルクタンの消費のしやすさは品種により異なり、萌芽特性や収量に影響を与えることが考えられた。

## 2.2 アスパラガスのフルクタン加水分解酵素 6G&1-FEH<sup>24)</sup>

伏せ込み促成栽培用品種の '太玉早生' において高いフルクトオリゴ糖分解活性が見られたことから、この品種の取穫後の貯蔵根からアスパラガス FEH の精製とその遺伝子クローニングを試みた。貯蔵根の抽出液から硫酸分画、各種クロマトグラフィーにより精製した酵素はゲルろ過クロマトグラフィー分析により、分子量が約 130 kDa と推定された。また、SDS-PAGE では約 68, 48, 16 kDa の 3 本のバンド (PepA, PepB, PepC とした) が検出された。これらの N 末端アミノ酸配列は PepA と PepB は同じ配列であり、PepC は異なる配列であった。

また、貯蔵根から他植物 FEH や細胞壁型インベルターゼのアミノ酸配列の相同性を利用して FEH 様遺伝子 (*aoeh4* と命名) を単離した。前述の PepA, PepB, PepC の N 末端アミノ酸配列は、この *aoeh4* 遺伝子の推定アミノ酸配列中に含まれており、また、LC-MS/MS による内部アミノ酸配列解析により、*aoeh4* 推定アミノ酸配列と一致するペプチドが見つかった。これらのことから貯蔵根から精製した酵素は *aoeh4* 遺伝子の翻訳産物であることがわかった。また、PepB, PepC は PepA の分解物であり、アスパラガス貯蔵根では PepA が二量体を形成して存在していることがわかった。

精製した酵素および *aoeh4* 遺伝子から作製した組換えタンパク質は、イヌリンやイヌリン型フルクタンの 1K や

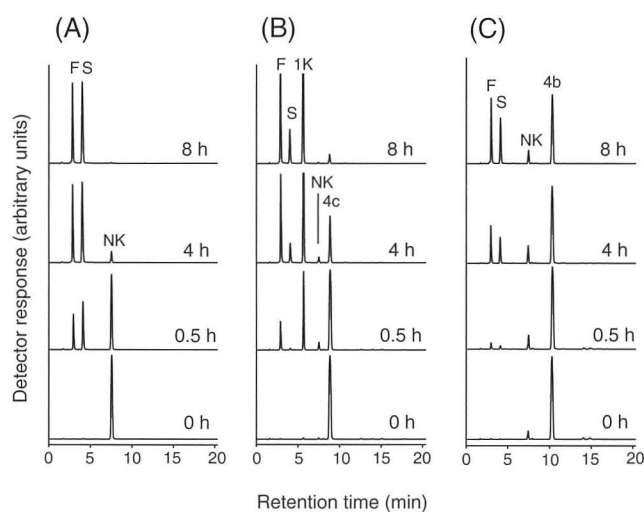


図3. アスパラガス FEH 精製酵素とイヌリンネオ型フルクタンとの酵素反応液の HPAEC 分析

基質を NK (A), 4c (B) および 4b (C) とし、30  $^{\circ}$ C で 0, 0.5, 4, 8 時間反応させた。反応液の HPAEC 分析のクロマトグラムを図に示した。F, fructose; 1K, 1-kestose; NK, neokestose; S, sucrose; 4b, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)sucrose; 4c, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -D-fructofuranosylsucrose (文献 24) から転載)。

Nys, フルクトシルニストース (F-Nys) から Fru を遊離したが、グルコースの遊離はなくイヌロビオースやイヌロトリオースなどのイヌロオリゴ糖は生成しなかった。また、Suc にも作用しないことから精製酵素及び組換え酵素は 1-FEH 活性を示すことがわかった。他植物の 1-FEH は主に、イヌリンよりも低分子の 1K や Nys に作用しやすい<sup>19,28,29)</sup> のに対してアスパラガス FEH の 1-FEH 活性は 1K に作用しにくい点が特徴的な点としてあげられる。この酵素は 1-FEH では作用しないイヌリンネオ型フルクタンの NK や 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -D-fructofuranosylsucrose (4c) にも作用し、Fru と Glc の  $\beta$ -2,6 結合をより強く加水分解した (図 3)。また、

1-FEHと同じく6Kやレバンの持つFru間の $\beta$ -2,6結合を加水分解する6-FEH活性は示さなかった。このように他の植物で同定されているFEHとは異なることからこの酵素をfructan 6G&1-exohydrolase (6G&1-FEH)と呼称することとした<sup>24)</sup>。

### 3. アスパラガスのフルクタン消費に関するFEHの役割

#### 3.1 6G&1-FEHの役割

アスパラガス6G&1-FEHが若茎萌芽のための貯蔵根のフルクタン分解に関与するかを検討した。伏せ込み促成栽培用品種の‘太宝早生’の根株堀上げ時から収穫期間中の貯蔵根を経時的にサンプリングし、フルクタン含量、酵素活性、遺伝子発現の変化を調査した。フルクタン含量はアスパラガス若茎の萌芽、収穫とともに徐々に減少したのに対し、6G&1-FEHをコードする遺伝子である*aoeh4*遺伝子の発現量は増加した<sup>24)</sup>(図4)。また、貯蔵根の粗酵素液中

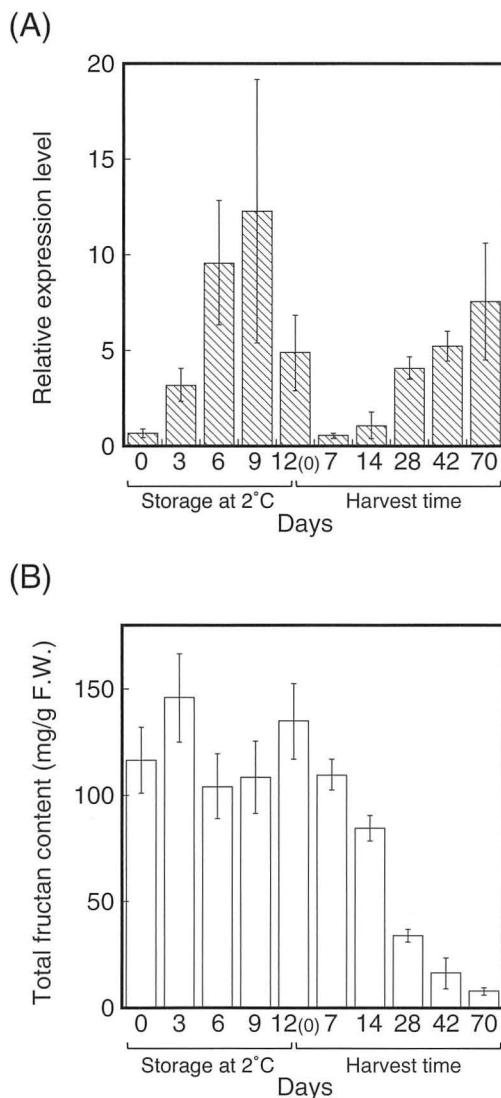


図4. 貯蔵根のフルクタン含量と*aoeh4*遺伝子発現の変動

アスパラガス貯蔵根を掘り上げ、2°Cで12日間低温を保持した後、ハウスに移し、アスパラガス若茎を萌芽させた。この間の貯蔵根の*aoeh4*遺伝子の発現量を(A)に、フルクタン含量を(B)に示した(文献24)から転載)。

のNK分解活性も*aoeh4*遺伝子と同様に変動した<sup>30)</sup>。このことから*aoeh4*遺伝子がコードする6G&1-FEHがアスパラガスの萌芽のためのフルクタン分解に関与することが明らかとなった。興味深い点として、*aoeh4*遺伝子は萌芽、収穫期だけでなく、根株に低温を与えたときにも遺伝子発現の増加が観察された。この低温処理は、萌芽を促進させるため、根株を強制的に低温状態とし、休眠打破を促す目的で実施しており、露地栽培における越冬の時期と同様の環境と考えられる。萌芽だけでなく、低温ストレスや休眠打破にフルクタンや6G&1-FEHが関与する可能性も考えられた。

#### 3.2 他のFEHの関与の可能性

アスパラガス6G&1-FEHはアスパラガスのフルクタンのうち、1Kや6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>2</sub>sucrose (4b)などに作用しにくく、アスパラガスのフルクタン抽出液を基質として反応させると反応液中にSuc, 1K, 4bなどの一部のオリゴ糖がフルクタンの分解物として残存し、増加する<sup>24)</sup>(図5)。このため、収穫期間中のアスパラガス貯蔵根でフルクタン分解が進むと、6G&1-FEHが作用しにくいオリゴ糖が残存すると考えたが、収穫後半の貯蔵根ではいずれのオリゴ糖も減少していた<sup>30)</sup>。このことから6G&1-FEHとは異なる他のフルクタン加水分解酵素が貯蔵根に存在する可能性が考えられた。また、貯蔵根から隣接する部位(地下茎やりん芽)へオリゴ糖が輸送される可能性もあるのかもしれない。

アスパラガスの6G&1-FEH以外のフルクタン加水分解

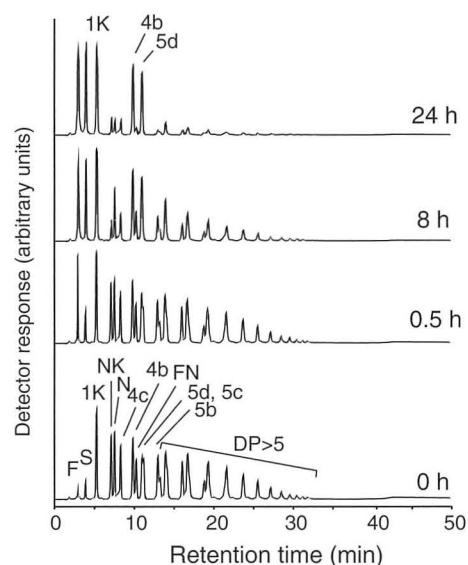


図5. アスパラガスFEH精製酵素とアスパラガスから抽出したフルクタンとの酵素反応液のHPAEC分析

基質をアスパラガスから抽出したフルクタンとし、30°Cで0, 0.5, 8, 24時間反応させた。反応液のHPAEC分析のクロマトグラムを図に示した。F, fructose; FN, fructosylnystose; 1K, 1-kestose; N, nystose; NK, neokestose; S, sucrose; 4c, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -D-fructofuranosylsucrose; 4b, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>2</sub>sucrose; 5b, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>3</sub>sucrose; 5c, 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)-6<sup>G</sup>- $\beta$ -D-fructofuranosylsucrose; 5d, 1<sup>F</sup>- $\beta$ -D-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>2</sub>sucrose (文献24)から転載)。

酵素遺伝子をゲノム配列情報から細胞壁型インベルターゼもしくはFEHの配列をもとに検索したところ、8種の候補遺伝子(この内の一つは*aoeh4*遺伝子)が該当した。これらの遺伝子のアスパラガス萌芽期の遺伝子発現変動をポット栽培で2か月生育させたアスパラガスを用いて行った。栽培は前述の伏せ込み促成栽培を模倣し、ハウス内で行い、試料は貯蔵根だけでなく、貯蔵根と隣接する地下茎と将来の若茎となるりん芽を用いた。その結果、*aoeh4*遺伝子はポット栽培アスパラガスでも収穫期の貯蔵根で遺伝子発現の上昇が確認された。この他の遺伝子では*aoeh7*と命名した遺伝子が貯蔵根だけでなく地下茎やりん芽で高い遺伝子発現を示した<sup>3)</sup>。現在、この*aoeh7*の機能解析を進めているところで、本遺伝子の翻訳産物が6G&1-FEHの作用しにくいオリゴ糖に作用するかは現在のところ不明ではあるがアスパラガスのフルクタンの分解に*aoeh4*遺伝子と協同して*aoeh7*遺伝子が関与する可能性が示唆された。

#### 4. おわりに

本稿では、アスパラガス萌芽の養分であるフルクタンの消費には、*aoeh4*遺伝子がコードする6G&1-FEHが関与し、また、未同定ではあるが*aoeh7*遺伝子がコードするタンパク質も協同して働く可能性について述べた。この他にもフルクタン分解に関与する可能性のある遺伝子が複数存在しており、どのような役割を示すのか興味深い。アスパラガスのフルクタンとその代謝酵素の役割解明を通して、アスパラガス生産性の向上や新たな栽培方法、育種などに有益な情報提供、農業への貢献ができるよう日々研究活動を進めているところである。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、アスパラガス栽培・サンプリングでご協力いただきました酪農学園大学フィールド教育センター職員ならびに農場生態学研究室の学生の皆様に感謝申し上げます。また、ともに研究を日々行いました酪農学園大学農食環境学群食と健康学類食品栄養化学研究室の学生の皆様に感謝申し上げます。本研究の一部は、酪農学園大学学内共同研究助成、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究C)19K06021の助成を受けて実施しました。

#### 文献

- G.A.F. Hendry: Evolutionary origins and natural functions of fructans: A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist*, **123**, 3-14 (1993).
- J. Edelman and T.G. Jefford: The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist*, **67**, 517-531 (1968).
- A. Van Laere and W. Van den Ende: Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell & Environment*, **25**, 803-813 (2002).
- Y. Ishiguro, K. Ueno, M. Abe, S. Onodera, E. Fukushi, N. Benkeblia, and N. Shiomi: Isolation and structural determination of reducing fructooligosaccharides newly produced in stored edible burdock. *Journal of Applied Glycoscience*, **56**, 159-164 (2009).
- Y. Ishiguro, S. Onodera, N. Benkeblia, and N. Shiomi: Variation of total FOS, total IOS, inulin and their related-metabolizing enzymes in burdock roots (*Arctium lappa* L.) stored under different temperatures. *Postharvest Biology and Technology*, **56**, 232-238 (2010).
- H. Hidaka, T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga, and Y. Tashiro: Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and Microflora*, **5**, 37-50 (1986).
- 藤井匡, 栃尾巧: ケストース生成酵素の改良. 応用糖質科学, **11**, 66-71(2021).
- G.D. Bonnett, I.M. Sims, R.J. Simpson, and A.J. Cairns: Structural diversity of fructan in relation to the taxonomy of the Poaceae. *New Phytologist*, **136**, 11-17 (1997).
- M. Yoshida, J. Abe, M. Moriyama, and T. Kuwabara: Carbohydrate levels among winter wheat cultivars varying in freezing tolerance and snow mold resistance during autumn and winter. *Physiologia Plantarum*, **103**, 8-16 (1998).
- N. Shiomi: Content of carbohydrate and activities of fructosyltransferase and invertase in asparagus roots during the fructooligosaccharide- and fructo-polysaccharide accumulating season. *New Phytologist*, **122**, 421-432 (1992).
- N. Shiomi, N. Benkeblia, and S. Onodera: The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: A comprehensive review. *Journal of Applied Glycoscience*, **52**, 121-127 (2005).
- 浦上敦子: 第1章. アスパラガスの生理生態と栽培特性. I 原産と来歴・特性について. 「アスパラガスの生理生態と生産事例」, 農耕と園芸編集部編, 誠文堂新光社, 東京, pp. 14-21 (2010).
- D.R. Shelton and M.L. Lacy: Effect of harvest duration on yield and on depletion of storage carbohydrates in asparagus roots. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **105**, 332-335 (1980).
- E. Pressman, A.A. Schaffer, D. Compton, and E. Zamski: Seasonal changes in the carbohydrate content of two cultivars of asparagus. *Scientia Horticulturae*, **53**, 149-155 (1993).
- W. Lammens, K. Le Roy, L. Schroeven, A. Van Laere, A. Rabijns, and W. Van den Ende: Structural insights into glycoside hydrolase family 32 and 68 enzymes: functional implications. *Journal of Experimental Botany*, **60**, 727-740 (2009).
- W. Van den Ende, A. Michiels, J. De Roover, and A. Van Laere: Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal*, **2**, 1281-1295 (2002).
- T. Ritsema, L. Hernández, A. Verhaar, D. Altenbach, T. Boller, A. Wiemken, and S. Smeeckens: Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *The Plant Journal*, **48**, 228-237 (2006).
- W. Van den Ende, A. Michiels, D. Van Wouterghem, S.P. Clerens, J. De Roover, and A.J. Van Laere: Defoliation induces fructan 1-exohydrolase II in Witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms, fructan 1-exohydrolase IIa and fructan 1-exohydrolase IIb. Mass fingerprint of the fructan 1-exohydrolase II enzymes. *Plant Physiology*, **126**, 1186-1195 (2001).
- K. Ueno, Y. Ishiguro, M. Yoshida, S. Onodera, and N. Shiomi: Cloning and functional characterization of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) in edible burdock (*Arctium lappa* L.). *Chemistry Central Journal*, **5**, 16 (2011).
- K. Ueno, S. Yokoshima, Y. Sasajima, Y. Ishiguro, M. Yoshida, N. Shiomi, and S. Onodera: Two fructan 1-exohydrolase isoforms hydrolyze fructans in edible burdock (*Arctium lappa* L.) during storage at a low temperature. *Journal of Applied Glycoscience*, **62**, 65-72 (2015).
- L. Van Riet, V. Nagaraj, W. Van den Ende, S. Clerens, A. Wiemken, and A. Van Laere: Purification, cloning and functional characterization of a fructan 6-exohydrolase from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, **57**, 213-223 (2006).
- K. Tamura, Y. Sanada, K. Tase, T. Komatsu, and M. Yoshida: Pp6-FEH I encodes an enzyme for degradation of highly po-

- lymerized levan and is transcriptionally induced by defoliation in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3421–3431 (2011).
- 23) A. Kawakami, M. Yoshida, and W. Van den Ende: Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene*, **358**, 93–101 (2005).
- 24) K. Ueno, T. Sonoda, M. Yoshida, N. Shiomi, and S. Onodera: Purification, characterization, and functional analysis of a novel 6 G&1-FEH mainly hydrolyzing neokestose from asparagus. *Journal of Experimental Botany*, **69**, 4295–4308 (2018).
- 25) A. Uragami, R. Ueno, A. Yamasaki, K. Matsuo, T. Yamaguchi, H. Tokiwa, T. Takizawa, H. Sakai, T. Ikeuchi, S. Watanabe, K. Matsunaga, M. Kunihiya, H. Kitazawa, and S. Motoki: Productive differences between male and female plants in white asparagus production using the rootstock-planting forcing culture technique. *The Horticulture Journal*, **85**, 322–330 (2016).
- 26) A. Uragami, A. Yamasaki, K. Matsuo K., T. Yamaguchi, H. Tokiwa, T. Takizawa, S. Motoki, K. Matsunaga, H. Kitazawa, S. Watanabe, Y. Shinzato, and T. Ikeuchi: Yield estimation of 1-year-old asparagus grown using rootstock-planting forcing culture. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **92**, 530–538 (2017).
- 27) 高村俊太, 上野敬司, 園田高広, 小野寺秀一: 伏せ込み促成栽培におけるアスパラガス品種の特性評価と収穫前根株の糖組成. 酪農学園大学紀要自然科学編, **40**, 1–6 (2015).
- 28) W. Van den Ende, S. Clerens, R. Vergauwen, L. Van Riet, A. Van Laere, M. Yoshida, and A. Kawakami: Fructan 1-exohydrolases.  $\beta$ -(2,1)-Trimmers during graminan biosynthesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping, and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. *Plant Physiology*, **131**, 621–631 (2003).
- 29) J. Lothier, B. Lasseur, K. Le Roy, A. Van Laere, M.P. Prud'homme, P. Barre, W. Van den Ende, and A.M. Bertrand: Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany*, **58**, 1969–1983 (2007).
- 30) K. Ueno, T. Sonoda, M. Yoshida, A. Kawakami, N. Shiomi, and S. Onodera: Decreased expression of fructosyltransferase genes in asparagus roots may contribute to efficient fructan degradation during asparagus spear harvesting. *Plant Physiology and Biochemistry*, **156**, 192–200 (2020).
- 31) 清水こはる, 吉田彩乃, 園田高広, 小野寺秀一, 上野敬司: アスパラガス地下部のフルクトオリゴ糖分解酵素遺伝子の探索. 令和2年度日本応用糖質科学会北海道支部 支部賞授賞式・受賞講演およびシンポジウム, 札幌 (2021).

## 質疑応答

[質問] 鹿児島大学 藤田清貴  
配列の相同性から *aoeh7* や 4 遺伝子の機能推定はできますか?

イヌリンの  $\beta$ 2,1 フルクトタンは比較的長いイメージを

持っておりますが, アスパラガスのフルクタンの鎖長について教えて頂けないでしょうか。

[回答]

*aoeh7* の推定アミノ酸配列中には, スクロースをドナー基質として認識するアミノ酸配列が保存されているため, インベルターゼと同様に *aoeh7* の翻訳産物は FEH とは異なりスクロースを分解するのではないかと推定しています。今後, 組換えタンパク質を作製して確認する予定です。 *aoeh4* は今回紹介した 6G&1-FEH をコードする遺伝子です。

アスパラガスのフルクタンの重合度は 20 程度で, チコリーやゴボウなどのイヌリンよりは短くなります。

[質問]

農研機構 山本和貴

キクイモ, ヤーコン等, fructose の多糖類・オリゴ糖を作る植物でも同様の酵素群が働くと考えて宜しいでしょうか。また, ホワイトアスパラガスでもグリーンアスパラガスと同様と考えて宜しいでしょうか。

[回答]

キクイモでは 3 種の 1-FEH がフルクトタン分解に関与することが知られています。ホワイトアスパラガスは萌芽する若茎を遮光し, 緑化しないように栽培する作型で, 品種はグリーンと同様のものが利用されます。よってグリーンとホワイトの違いによるフルクトタン分解酵素群の違いはないと考えています。

[質問]

北海道大学 田上貴祥

フルクトタン分解酵素は一部が限定分解を受けているようですが, 限定分解は酵素の安定性や活性に影響を与えるのでしょうか?

[回答]

貯蔵根から精製した酵素では SDS-PAGE で複数バンドが検出され, 限定分解が推定されますが, 組換え酵素においては単一バンドで検出されます。両者のオリゴ糖の分解パターンには違いが見られませんが, 酵素の安定性や速度パラメーターには違いが見えてくる可能性があり今後, 調査したいと思います。