

氏名	高山 真理子		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 7556 号		
学位授与年月日	平成 27年 9月 25日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	トマト果実におけるグルタミン酸脱炭酸酵素の機能解析		
主査	筑波大学教授	博士 (農学)	江面 浩
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	菅谷 純子
副査	筑波大学教授	博士 (農学)	松倉 千昭
副査	筑波大学准教授	博士 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学助教	博士 (農学)	有泉 亨

論 文 の 要 旨

γ -アミノ酪酸 (GABA) は動植物や微生物に遍在するアミノ酸の一つで、動物では主に神経伝達物質として機能することが知られている。一方、植物においてはストレス応答、細胞内 pH の調整、食害防御など様々な生体反応への関与が示唆されているが、その明確な機能は未だ不明である。

ナス科植物であるトマトは、他の蔬菜類と比較して GABA を多量に蓄積することが知られており、また、その蓄積量は果実発達過程で大きく変動することが報告されている。しかしながら、トマト果実における GABA の蓄積メカニズムやその生理的意義は十分に解明されていない。そこで本研究では、トマト果実における GABA の生合成に着目し、その分子機構を明らかにするとともに、トマト果実における GABA の生理機能を探索することを目的とした。

グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) は動物や微生物において、GABA 生合成の鍵酵素として知られており、先行研究においてトマトのモデル品種 'Micro-Tom' の果実から 3 つの GAD 遺伝子ホモログ (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) が単離された。そこで本研究では、単離された 3 つの *SIGAD* 遺伝子がトマト果実において GABA の生合成に関与しているかを明らかにするため、*SIGAD* 遺伝子の発現抑制形質転換体を作成した。その結果、3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現を同時に抑制した形質転換体では、緑熟期と赤熟期における果実内 GABA 含量が野生型の 1/10 以下に低下することが明らかとなり、トマト果実における GABA の生合成には動物や微生物と同様、GAD が重要な働きをしていることが示唆された。また、*SIGAD1* の発現を特異的に抑制した形質転換体では、野生型と比較して果実内 GABA 含量に大きな差がみられなかったのに対し、*SIGAD2* あるいは *SIGAD3* の発現を特異的に抑制した形質転換体では減少傾向がみられた。特に *SIGAD3* の発現抑制形質転換体では緑熟期と赤熟期における果実内 GABA 含量が野生型の 1/10 程度に強く減少した。これらの結果から、トマト果実における GABA の生合成には *SIGAD2* および *SIGAD3* が関

与し、少なくとも *SIGAD3* の発現は果実内 GABA 含量に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

3つの *SIGAD* 遺伝子の発現を同時に抑制した形質転換体では、果実内 GABA 含量の著しい抑制がみられたことから、トマト果実における GABA の生理機能を明らかにする上で有用な材料になると考えられた。しかしながら、これら GABA 低蓄積組換えトマトの見かけの表現型には異常はみられず、GABA の機能を明らかにする手がかりは得られなかった。そこで、GABA 低蓄積組換え体と非組換え体の特性をより詳細に調査するため、緑熟果実および赤熟果実に含まれる一次代謝産物の一斉解析を行った。非組換え体と比較して、複数系統の GABA 低蓄積組換えトマトにおいて有意差がみられた代謝産物を選別した結果、緑熟果実および赤熟果実における GABA 含量の減少と、緑熟果実におけるグルタミン酸含量の増加のみが抽出された。このことから、トマト果実における GABA 蓄積量の低下は植物体や果実の発達だけでなく、他の一次代謝産物の含量にもほとんど影響を及ぼさないことが示唆された。

トマト果実における GABA の機能解明には、GABA を過剰蓄積したときの影響も調査する必要があると考えられた。また、GABA は人体において、血圧上昇抑制効果やストレス緩和効果をもたらすことが明らかにされている。そこで、最後に GABA 高含有トマトの作出を試みた。そのアプローチとして、本研究で GABA の生合成に重要であることが示唆された *SIGAD3* を、果実成熟期に誘導がかかる E8 プロモーターと、外来遺伝子の高発現化において有効なシロイヌナズナのヒートショックプロテイン遺伝子ターミネーターを用いて過剰発現させた。また、他の植物種において、GAD 酵素は C 末の 30-50 アミノ酸残基を切除することで活性化することが報告されているため、本研究においても *SIGAD3* の C 末切除の効果を検証した。その結果、赤熟果実における果実内 GABA 含量は野生型で $1.6 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ であったのに対し、正常な *SIGAD3* を発現させた組換え体では最大で $15 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ 、C 末を切除した変異型 *SIGAD3* を発現させた組換え体では最大で $29 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ にまで蓄積量を高めることができた。また、C 末を切除した変異型 *SIGAD3* を発現させた組換え体の果実では、着色や果実成熟期のエチレン生産に異常がみられたものの、植物体の発達には影響がみられなかった。

審 査 の 要 旨

本学位論文では、トマト果実における GABA の生合成に着目し、その分子機構を明らかにするとともに、トマト果実における GABA の生理機能の解明に取り組んだ。その結果、トマト果実の GABA 生合成を制御する主な鍵遺伝子が *SIGAD3* であることを明らかにするとともに、その遺伝子を遺伝子工学的に発現制御することにより、植物体の発達に影響の少ない高 GABA 蓄積トマトの開発が可能であることを実証した。加えて、GABA が果実の成熟制御において重要な役割を果たしていることを初めて示唆した。これらの成果は、学術研究としては GABA 生合成の鍵遺伝子を解明したこと、GABA の果実の成熟制御における役割を示唆したことから極めて意義のある研究であると判断された。さらに、ヒトの健康機能性成分として着目されている GABA をトマト果実に高蓄積する分子育種技術を開発したことから、技術開発研究としても高く評価される研究であると判断された。

平成 27 年 7 月 23 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。