

# 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

2015 年 1 月

高山 真理子

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

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物圏資源科学専攻

博士（農学）学位論文

高山 真理子

## 目次

目次

略語表

序論	・・・	1
図表	・・・	7
第1章 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	・・・	8
1-1 緒言	・・・	9
1-2 材料および方法	・・・	9
1-3 結果	・・・	21
1-4 考察	・・・	26
図表	・・・	30
第2章 GABA 低蓄積組換えトマトと非組換えトマトのメタボローム解析	・・・	47
2-1 緒言	・・・	48
2-2 材料および方法	・・・	48
2-3 結果	・・・	49
2-4 考察	・・・	51
図表	・・・	54
第3章 GABA 高含有トマトの作出	・・・	58
3-1 緒言	・・・	59
3-2 材料および方法	・・・	60
3-3 結果	・・・	62
3-4 考察	・・・	65
図表	・・・	72
総合考察	・・・	83
摘要	・・・	90
謝辞	・・・	92
引用文献	・・・	93

## 略語表

bp	base pair, 塩基対
Br	breaker, ブレーカー
CaM	calmodulin, カルモジュリン
CaMV	cauliflower mosaic virus, カリフラワーモザイクウイルス
CDS	coding sequence, コード配列
EC	electric conductivity, 電気伝導度
DIG	digoxigenin, ジゴキシゲニン
FW	fresh weight, 生鮮重
GABA	$\gamma$ -amino butyric acid, $\gamma$ -アミノ酪酸
GABA-T	GABA transaminase, GABA アミノ基転移酵素
GABA-TG	glyoxylate-dependent GABA transaminase, グリオキシル酸依存型 GABA アミノ基転移酵素
GABA-TK	$\alpha$ -ketoglutarate-dependent GABA transaminase, $\alpha$ -ケトグルタル酸依存型 GABA アミノ基転移酵素
GABA-TP	pyruvate-dependent GABA transaminase, ピルビン酸依存型 GABA アミノ基転移酵素
GAD	glutamate decarboxylase, グルタミン酸脱炭酸酵素
GDH	glutamate dehydrogenase, グルタミン酸脱水素酵素
GHB	$\gamma$ -hydroxybutyric acid, $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸
GOGAT	glutamate synthase, グルタミン酸合成酵素
GS	glutamine synthase, グルタミン合成酵素
HSP	heat shock protein, 熱ショックタンパク質
NAD	nicotinamide adenine dinucleotide, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NOS	nopaline synthase, ノパリン合成酵素
MG	mature green, 緑熟
PCR	polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-PCR, 定量的逆転写 PCR
RNAi	RNA interference, RNA 干渉
rpm	revolution per minute, 回毎分
SSA	succinic semialdehyde, コハク酸セミアルデヒド
SSADH	succinic semialdehyde dehydrogenase, コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素
SSR	succinic semialdehyde reductase, SSA 還元酵素
TAE	tris-acetate, EDTA buffer, トリス酢酸エチレンジアミン四酢酸緩衝液



TCA 回路  
WT

tricarboxylic acid cycle, トリカルボン酸回路  
wild type, 野生型

## 序論

近年、高血圧、糖尿病、高脂血症、肥満など、いわゆる「生活習慣病」を発症する患者が急増しており、深刻な社会問題となっている。その中でも高血圧は最も頻度の高い病気で、世界保健機関（WHO）の調査によると、世界で10億人以上が、日本でも4300万人が高血圧を発症していると推測されている。高血圧は、脳卒中、心疾患、腎不全など多くの重篤な疾患を招く危険因子とされており（日本高血圧学会、2014）、その予防および治療は非常に重要である。高血圧の治療には降圧剤を用いた薬物療法が有効とされているが、副作用に悩まされる患者も少なくない。従って、軽症高血圧者やその予備軍である正常高血圧者など、症状は比較的軽度であるが予防が必須な患者においては、薬物療法よりも生活習慣（食習慣、運動習慣）の改善による治療法が基本となっている。

高血圧を含めた生活習慣病の予防において、食品の3次機能（生体調節機能）が注目を集めている。その中でも、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）は血圧上昇抑制効果を有する成分として初期から高い関心が寄せられ、様々な分野で研究が進められてきた（Kazami et al. 2002; Inoue et al. 2003; Kajimoto et al. 2004）。GABAは動物、植物あるいは微生物に遍在する非タンパク質構成アミノ酸の一つで、哺乳動物においては抑制性の神経伝達物質として機能することが知られている（Owens and Kriegstein 2002）。また、人体においてはGABAを経口摂取することで、血圧上昇抑制効果に加え、ストレス緩和効果（Abdou et al. 2006）や更年期及び初老期にみられる自律神経障害（抑うつ、不眠、イライラ）の改善に効果があることが報告されている（Okada et al. 2000）。また、GABAは多種多様な食材に含まれ、古くから自然に摂取されてきた。そのため、日常的な食事を通して人々の健康に寄与し得る、安全で有用な成分として期待されている。

このような背景から、植物分野では農作物にさらにGABAを高蓄積化させる技術の開発が行われてきた。例えば、茶においては生葉を嫌気的条件下に置くことでGABA含量が増加することが見出され（Tsushida et al. 1987）、この加工操作によって得られた緑茶は「ギャバロン茶」という名で製品化された。また、イネにおいては玄米を水に浸漬させること、発芽させることによってGABA含量が増加することが明らかにされている（Saikusa et al. 1994; Jannoey et al. 2010）。さらに、GABAの蓄積制御に関わる分子メカニズムを遺伝子工学的に改変することで、収穫後処理を行わなくてもGABAを高蓄積する組換えイネも作出されている（Akama et al. 2009; Shimajiri et al. 2013a）。

ナス科植物であるトマトは、他の主要な作物と比較して果実内に多量のGABAを蓄積することが知られており、その含量はハクサイやハウレンソウの約40-60倍、同じナ

ス科作物であるジャガイモ、ピーマン、ナスと比較しても約2-15倍である (Matsumoto et al. 1997) . また、トマトは、ジャガイモに次いで世界で最も生産されている野菜であり (FAO「FAOSTAT」2013 統計) , 生食から加工品までその用途が広いこと、栄養価が高いことから人気を博している. そのため、トマトを素材にさらに GABA を高蓄積化させる技術を確立することができれば、より多くの人々の健康に寄与できる可能性がある. そこで筆者の所属研究室では、GABA 高含有トマトの作出を目標とし、これまでに遺伝資源の探索や GABA を高蓄積化させるための栽培技術の検討を行ってきた.

遺伝資源の探索では、栽培品種 61 系統および野生種の中から果実内 GABA 含量が高い系統がスクリーニングされ、複数回の栽培試験において安定して高い GABA 含量を示した系統 'DG03-9' が選抜された (Saito et al. 2008b) . 一般的な栽培品種のトマトでは、果実内 GABA 含量は果実肥大が止まる緑熟期に最大に達し、果実の着色が始まるブレイカーステージを境に急激に減少することが報告されている (Rolin et al. 2000) . しかしながら、この 'DG03-9' は通常の GABA 蓄積を示す 'Micro-Tom' や 'ハウス桃太郎' と比較して緑熟期における GABA 含量には顕著な差はみられないものの、ブレイカー以降の成熟ステージにおける減少率が低いことが明らかにされた (Saito et al. 2008b; Akihiro et al. 2008) . また、'DG03-9' と 'ハウス桃太郎' を高血圧ラットに与える実験では、'ハウス桃太郎' と比較して 'DG03-9' の方がより強い血圧降下作用を有することが認められた (Yoshimura et al. 2010) . これらの結果から、'DG03-9' は抗血圧上昇作用を有する優良なトマト品種であることが示され、後に商品化された. また、植物において GABA は様々な環境刺激 (塩, 熱, 低温, 低酸素, 機械的刺激, 植物ホルモン) に応答して蓄積量が増加することが明らかにされていることから (Bown and Shelp 1997; Shelp et al. 1999; Mazzucotelli et al. 2006; Renault et al. 2010) , トマト果実内の GABA 含量を増加させる栽培技術の検討が行われた. その結果、栽培する環境 (圃場または温室) によって最適条件は変化するものの、根域制限や塩ストレス処理が果実内 GABA 含量を増加させる上で効果があることが明らかにされた (Saito et al. 2008a) .

トマト果実における GABA 蓄積を高める別のアプローチとして、イネの研究例 (Akama et al. 2009; Shimajiri et al. 2013a) のように、GABA の蓄積制御に関わる分子メカニズム自体を改変することも有効であるかもしれない. しかしながら、トマト果実における GABA の蓄積制御メカニズムは未だ十分に解明されていない. 他の生物種において、GABA は主に GABA シヤントと呼ばれる短い経路において代謝されると考えられて

いる (Satya-Narayan and Nair 1990; Bouché and Fromm 2004a) . この GABA シヤントは、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) , GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T) , コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SSADH) の 3 つの酵素が触媒する反応から構成されており、トリカルボン酸 (TCA) 回路の 2 ステップ ( $\alpha$ -ケトグルタル酸からコハク酸への酸化反応) をバイパスする経路となっている (Fig. 1) .

GABA シヤントの 1 番目の酵素である GAD は、細胞質においてグルタミン酸と  $H^+$  から GABA と  $CO_2$  を生産する反応を触媒し、GABA 生合成の鍵酵素と考えられている。植物の GAD はピリドキサルリン酸 (PLP) 依存型の酵素で、主に 6 量体の形で存在している (Gut et al. 2009) . また、植物の GAD の C 末端には、動物や細菌には存在しない伸長領域 (30-50 アミノ酸残基) がしばしば観察され、この領域にはカルモジュリン (CaM) 結合ドメインが存在することが知られている (Baum et al. 1993; Yap et al. 2003) . *in vitro* の研究では、GAD の酵素活性が低 pH (<6.0) , あるいは生体 pH における CaM 結合ドメインへの  $Ca^{2+}/CaM$  複合体の結合により上昇することが明らかにされている (Snedden et al. 1996) . さらに、組換え体を用いた研究では、C 末の CaM 結合ドメインを切除することにより植物体内の GABA 蓄積量が増加することが明らかにされている (Baum et al. 1996) . これらの知見から、植物の GAD が保持する C 末の伸長領域は、 $Ca^{2+}/CaM$  複合体が存在しない条件 (非ストレス条件下など) においては自己阻害的な役割を果たし、一方、 $Ca^{2+}/CaM$  複合体が存在する条件 (細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を引き起こすようなストレス条件下など) や低 pH 条件では自己阻害が解除され、結果的に活性が上昇すると考えられている。しかしながら、近年、イネおよびリンゴの研究において新しいタイプの GAD が同定された (Akama et al. 2001; Akama and Takaiwa 2007; Trobacher et al. 2013) . イネ GAD2 (OsGAD2) およびリンゴ GAD3 (MdGAD3) はいずれも C 末の伸長領域を保持しているものの、その領域には CaM 結合ドメインが存在しない。そのため、両酵素は  $Ca^{2+}/CaM$  に依存しない酵素活性を示す。また、OsGAD2 の C 末伸長領域は自己阻害ドメインとして機能する一方、MdGAD3 の C 末伸長領域は自己阻害ドメインとしての機能も有さず、結果としてこの酵素は恒常的に活性化された状態で存在している。これらのことから、植物には GAD の活性化を制御する仕組みが複数存在しており、目的に応じて使い分けられていると考えられる。

GABA シヤントの 2 つ目の酵素反応を触媒する GABA-T には、 $\alpha$ -ケトグルタル酸をアミノ基受容体として利用する  $\alpha$ -ケトグルタル酸依存型 GABA-T (GABA-TK) とピルビ

ン酸をアミノ基受容体として利用するピルビン酸依存型 GABA-T (GABA-TP) が存在する (Shelp et al. 1999) . GABA-TK は GABA と  $\alpha$ -ケトグルタル酸から SSA とグルタミン酸を, GABA-TP は GABA とピルビン酸から SSA とアラニンをそれぞれ生産する (Fig. 1) . 動物には GABA-TK のみが存在すると考えられており, 実際に GABA-TK をコードする遺伝子が単離・同定されている. 一方, 植物においては GABA-TK, GABA-TP 双方の活性が確認されているが, 現在までに植物から GABA-TK をコードする遺伝子が単離された例はない. また, 植物において GABA-TP をコードする遺伝子はタバコ, シロイヌナズナ, トマト, イネなどから単離されているが, 近年の研究において, これらの単離された GABA-TP タンパク質はアミノ基受容体としてピルビン酸だけでなくグリオキシル酸を利用するグリオキシル酸依存型 GABA-T (GABA-TG) 活性をも示すことが明らかにされている (Clark et al. 2009a, b; Shimajiri et al. 2013b) . さらに, 従来, GABA-T はミトコンドリアのみで働く酵素であると考えられてきたが, 近年のトマトやイネの研究により, 細胞質や色素体に局在するアイソフォームも存在することが明らかにされている (Clark et al. 2009b; Shimajiri et al. 2013b) .

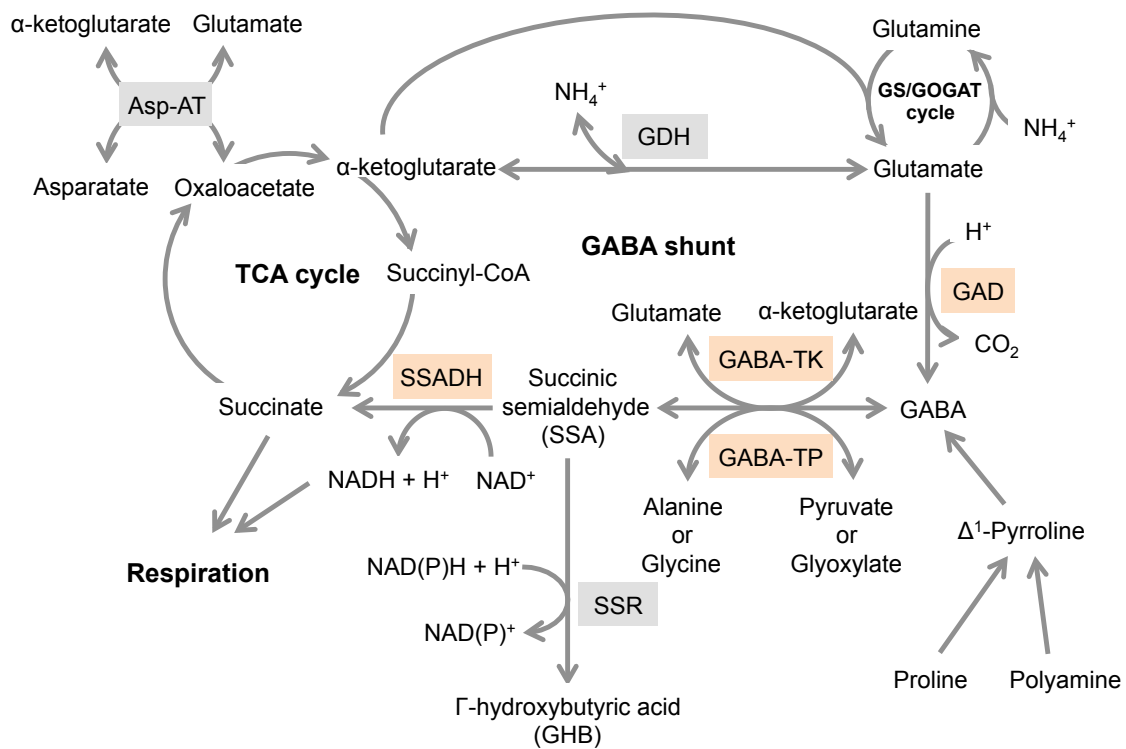
GABA シャントの 3 つ目の酵素反応を触媒する SSADH は SSA と  $\text{NAD}^+$  からコハク酸と NADH を生成する (Fig. 1) . SSADH により生成されたコハク酸と NADH は, ミトコンドリアの呼吸鎖において ATP 生産の基質として利用される (Bouché and Fromm 2004a) . また, SSADH 活性はミトコンドリア内のエネルギー状態に依存することが知られており (Busch and Fromm 1999) ,  $\text{NAD}^+:\text{NADH}$  比が低下するようなストレス条件にさらされると SSADH 活性は抑制され, SSA の蓄積と GABA-T のフィードバック阻害が生じる (Busch and Fromm 1999; Van Cauwenberghe and Shelp 1999) . また, ストレス条件において, SSA は GABA シャントとは異なる経路を介して  $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) に変換されることが報告されている (Fig. 1) . この反応は SSA 還元 (SSR) 活性を有する酵素によって触媒され (Breitkreuz et al. 2003; Hoover et al. 2007; Simpson et al. 2008) , 有害な SSA を分解することでストレス耐性に寄与することが示唆されている (Breitkreuz et al. 2003; Allan et al. 2008) .

これらの様々な生物種において報告されている知見をもとに, 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*), 3 つの GABA-TP 遺伝子ホモログ (*SIGABA-T1*, *SIGABA-T2*, *SIGABA-T3*), 1 つの SSADH 遺伝子ホモログ (*SISSADH*) が単離された (Akihiro et al. 2008) . その中

でも *SIGABA-TP* 遺伝子 (*SIGABA-T1*, *SIGABA-T2*, *SIGABA-T3*) に関しては、個々の遺伝子の機能欠失実験により機能解析が行われ、ミトコンドリア局在型の *SIGABA-T1* による GABA 代謝がトマト果実の GABA 蓄積量に大きな影響を及ぼすこと、種子・果実の形成において重要な役割を担っていることが明らかにされた (Koike et al. 2013)。しかしながら、*SIGAD* および *SISSADH* 遺伝子の詳細な機能は未だ不明である。そこで本研究では、GABA 高含有トマトの作出に向けた新たな知見を得ることを目的とし、GABA 生合成への関与が見込まれる 3 つの *SIGAD* 遺伝子 (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) の機能解析を行うこととした。

また、トマトは他の作物と比較して GABA を多量に蓄積する種であることが報告されているものの (Matsumoto et al. 1997)、その生理的な役割は十分に解明されていない。植物において GABA 及びその代謝は、花粉管伸長の制御 (Palanivelu et al. 2003; Yu et al. 2014)、食害および病原菌侵略からの防御 (Bown et al. 2006; Seifi et al. 2013)、ROS 生産の制御 (Shi et al. 2010; Liu et al. 2011; Bao et al. 2014)、細胞伸長の抑制 (Renault et al. 2011)、細胞内 pH の調整 (Carroll et al. 1994; Crawford et al. 1994)、窒素貯蔵 (Bown and Shelp 1997) に関与することが示唆されている。しかしながら、動物と比較すると植物における GABA の機能は依然として不明確であり、また、果実に関しては情報が乏しいのが現状である。そのため、果実を形成し、かつ、その発達過程で GABA を多量に蓄積するトマトにおいて GABA の機能を明らかにすることは、植物 GABA 研究の進展に貢献する重要な課題と考えられる。そこで本研究では、トマト果実における GABA の生理機能を明らかにすることをもう 1 つの目的とした。

本論文の第 1 章では、先行研究で単離された 3 つの *SIGAD* 遺伝子 (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) がトマト果実内で GABA の生合成に関与しているかを明らかにするため、各遺伝子の発現抑制体あるいは過剰発現体を作成し、果実内 GABA 含量への影響を調査した。続いて第 2 章では、トマト果実における GABA の生理機能を探求するため、第 1 章で作出した GABA の蓄積量に変化した組換えトマトと非組換えトマトを用いて果実内一次代謝物の比較解析を行った。最後に第 3 章では、第 1 章で得られた知見を活かし、トマトに GABA を効果的に高蓄積化させる手法の検討を行った。



**Fig. 1 TCA 回路および GABA シヤント代謝経路**

GABA シヤントは、グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)、GABA アミノ基転移酵素 (GABA-T)、コハク酸セミアルデヒド脱水素酵素 (SSADH) の 3 つの酵素が触媒する反応から構成され、TCA 回路の 2 ステップ ( $\alpha$ -ケトグルタル酸からコハク酸への酸化反応) をバイパスする経路となっている。コハク酸セミアルデヒド (SSA) の代謝には GABA シヤントとは異なる経路も存在することが示唆されており、その経路において SSA は SSA 還元酵素 (SSR) による触媒を受け、 $\gamma$ -ヒドロキシ酪酸 (GHB) に変換される。



## 第 1 章

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

## 1-1 緒言

先行研究においてトマトのモデル品種 ‘Micro-Tom’ の果実から GABA 代謝関連遺伝子として 3 つの *GAD* 遺伝子ホモログ (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) , 3 つの *GABA-TP* 遺伝子ホモログ (*SIGABA-T1*, *SIGABA-T2*, *SIGABA-T3*) , 1 つの *SSADH* 遺伝子ホモログ (*SISSADH*) が単離され, 果実発達段階別にこれらの遺伝子発現量と GABA 含量が解析された. その結果, *SIGAD2* および *SIGAD3* の発現時期が果実内 GABA 含量の増加する時期と一致していることが明らかとなった (Akihiro et al. 2008) . また, 先行研究において GABA 高含有品種 ‘DG03-9’ が選抜され (Saito et al. 2008b) , 通常の GABA 蓄積を示す ‘Micro-Tom’ との比較解析が行われた (Akihiro et al. 2008) . その結果, ‘DG03-9’ は ‘Micro-Tom’ と比較して, 赤熟期における GABA の減少率が低く, 高い GAD 活性を維持すること, ‘DG03-9’ および ‘Micro-Tom’ の GABA 含量はいずれも *SIGAD2* と *SIGAD3* の遺伝子発現と正の相関があることが明らかとなった (Akihiro et al. 2008) . これらの結果から, トマト果実における GABA の生合成には他の生物種と同様に GAD の酵素活性が重要な役割を果たしており, トマトに存在する複数の GAD アイソフォームの中でも *SIGAD2* および *SIGAD3* が主要に働くのではないかという仮説が浮上した. そこで本研究では, これらの仮説を実験的に証明するため, トマト果実から単離された 3 つの *GAD* 遺伝子ホモログ (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) についてそれぞれ発現抑制体を作成し, 各 *SIGAD* 遺伝子の発現制御が果実内 GABA 含量にどのような影響を及ぼすかを調査した. また, *SIGAD3* に関しては過剰発現体も作成し, 同様の解析を行った.

## 1-2 材料および方法

### 1-2-1 供試植物

供試植物はトマト (*Solanum lycopersicum* L.) のモデル品種 ‘Micro-Tom’ (トマト National Bioresource Project, NBRP より分譲) を用いた.

### 1-2-2 RNAi コンストラクトの構築

*SIGAD* 遺伝子の発現抑制形質転換体を作成するため, *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* および 3 つの *SIGAD* 遺伝子の相同領域を標的とする計 4 種類の RNAi コンストラクトを構築した (各コンストラクトは以下 *RNAi-SIGAD1*, *-SIGAD2*, *-SIGAD3*, *-SIGADall* と表記する) . *RNAi-SIGAD1*, *-SIGAD2*, *-SIGAD3* の標的 DNA 配列は, 各遺伝子の特異性を高めるため, 3

つの*SIGAD*遺伝子間で比較的相同性が低い (26-53% nucleotide identity) 3'UTR配列を含むようにそれぞれ設定した (Fig. 2) . また, *RNAi-SIGADall*の標的DNA配列は, 3つの*SIGAD*遺伝子間で比較的相同性が高い (>76% nucleotide identity) ORF配列を用いた. この際, テンプレートには*SIGAD2*のcDNA配列を用いた (Fig. 2) . 続いて, トマト果実由来のcDNAをテンプレートとし, 設定した各標的DNA配列を増幅させるためのPCRを行った. PCRの組成はKOD-plus (TOYOBO) 1  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer (TOYOBO) 5  $\mu$ l, 2 mM each dNTPs 5  $\mu$ l, 25 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Forward primer 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Reverse primer 5  $\mu$ l, 超純水25  $\mu$ l, 10倍希釈したcDNA 2  $\mu$ lの計50  $\mu$ lとし, 反応条件は98°C; 2分の後, 98°C; 15秒, 53-68°C; 30秒, 68°C; 30秒を35サイクル行い, 最後に68°C; 10分の反応を行った. このとき使用したcDNAは, 標的となる*SIGAD*遺伝子が発現する時期の 'Micro-Tom' の果実から合成されたもので, *SIGAD1*の増幅には赤熟果実 (開花後43-45日), *SIGAD2*, *SIGAD3*の増幅には緑熟果実 (開花後25-27日) を使用した. cDNAは果実からRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出したRNAを, SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて逆転写したものを使用した. PCRに用いた各遺伝子のプライマーはTable 1に示した通りである. 得られたPCR産物は1%アガロースゲルと泳動バッファー1 $\times$ TAE溶液を用いて電気泳動を行い, 特異的に増幅していることを確認した.

続いて, 増幅したPCR産物をエントリーベクターであるpCR8/GW/TOPO (Invitrogen) にTAクローニングにより導入した. その後, クローニングしたPCR産物の塩基配列をBig Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて確認した. シークエンス反応にはpCR8/GW/TOPOベクターの配列をプライマーに用いた. 反応組成は5 $\times$ Sequence Buffer 3.7  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Primer 0.5  $\mu$ l, Big Dye 0.5  $\mu$ l, プラスミド (150ng) に超純水を加えて計20  $\mu$ lとし, 反応条件は96°C; 2分の後, 96°C; 10秒, 50°C; 5秒, 60°C; 4分を35サイクル行った. シークエンス反応後の反応液はエタノール沈殿により精製を行い, ABI3130 (Applied Biosystems) を用いて塩基配列の確認を行った.

続いて, GATEWAY Cloning技術を利用して各RNAi標的配列を, エントリーベクターから植物形質転換用バイナリーベクターであるpANDA35HK vector (Miki and Shimamoto 2004) , あるいはpBI-sense, antisense-GW (Inplanta innovations) にLR反応により導入した (Fig. 3A) . pANDA35HK vectorおよびpBI-sense, antisense-GWは, いずれもカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35Sプロモーター制御下で標的遺伝子由来の短いヘアピンRNAを発現するRNAi用のベクターである. LR反応にはLR Clonase® II Enzyme Mix

(Invitrogen) を用いた。反応組成はpCR8/GW/TOPO ベクター 150 ng, pANDA35HK vector あるいはpBI-sense, antisense-GW 150 ng, LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme Mix 1  $\mu$ lに1 $\times$ TEを加えて計9  $\mu$ l とし, 25 $^{\circ}$ Cで9時間反応させた。その後, 反応液にProteinase K (Invitrogen) 0.5  $\mu$ lを加え, 37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートすることで反応を終了させた。構築したコンストラクトはエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (GV2260株) に形質転換した。

### 1-2-3 SIGAD3 過剰発現コンストラクトの構築

SIGAD3に関してはCaMV35Sプロモーターを用いた過剰発現コンストラクトの作製も行った (以下, 35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>と表記する)。まず, Table 1に示した遺伝子特異的なプライマーとトマト果実由来のcDNAをテンプレートに用いて, SIGAD3のコーディング配列 (CDS) をPCRにより増幅した。PCRの組成はKOD-plus (TOYOBO) 1  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer (TOYOBO) 5  $\mu$ l, 2 mM each dNTPs 5  $\mu$ l, 25 mM MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Forward primer 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Reverse primer 5  $\mu$ l, 超純水 25  $\mu$ l, 10倍希釈したcDNA 2  $\mu$ lの計50  $\mu$ lとし, 反応条件は98 $^{\circ}$ C; 2分の後, 98 $^{\circ}$ C; 15秒, 59 $^{\circ}$ C; 30秒, 68 $^{\circ}$ C; 30秒を35サイクル行い, 最後に68 $^{\circ}$ C; 10分の反応を行った。このとき使用したcDNAもSIGAD3遺伝子が発現する緑熟期の‘Micro-Tom’果実から合成したものをを用いた。得られたPCR産物は1%アガロースゲルと泳動バッファー1 $\times$ TAE溶液を用いて電気泳動を行い, 特異的に増幅していることを確認した。

続いて, 増幅したPCR産物 (1,455 bp) をエントリーベクターであるpCR8/GW/TOPO (Invitrogen) にTAクローニングにより導入し, (1-2-2) と同様の方法で塩基配列の確認を行った。

続いて, GATEWAY Cloning技術を利用してSIGAD3のCDSを, エントリーベクターから植物形質転換用バイナリーベクターであるpBI-OX-GW (Inplanta inovatios) にLR反応により導入した (Fig. 3B)。LR反応は (1-2-2) と同様の方法で行った。構築したコンストラクトはエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (GV2260株) に形質転換した。

### 1-2-4 アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換

トマトへの形質転換はアグロバクテリウム法を用いた。当研究室のトマトの高効率形

質転換プロトコール (Sun et al. 2006) に準拠して行った。

#### 1-2-4-1 無菌播種

‘Micro-Tom’ の種子を 5 cm 四方のガーゼに 100 粒ずつ包み、針金で留め、50 ml コーニングチューブ内で 10 倍希釈した花王キッチンハイター（次亜塩素酸ナトリウム系の洗浄剤）に 30 分間浸し種子を表面殺菌した。その後、種子を滅菌水で 3 回すすぎ、3 回目の滅菌水の中で、発芽をそろえるために一晩吸水させた。表面殺菌された種子の水分を滅菌したキムタオルで取り除き、播種用 MS 固形培地 [MS 培地, 3% スクロース, 0.3% ゲランガム, pH 5.8] に播種した。播種した種子は 25°C, 16 時間日長の培養室で発芽させ、子葉が完全に展開し、本葉が数 mm 伸びてきた播種後 7-10 日後の子葉を形質転換に用いた。

#### 1-2-4-2 アグロバクテリウム感染液の調製

構築したコンストラクトを保持するアグロバクテリウムのグリセロールストック 20  $\mu$ l を、カナマイシン 100 mg/l の濃度になるように調製した LB 液体培地 2 ml に植菌し、暗黒下で 28°C, 24 時間振とう培養した。培養液を 5000 rpm で 5 分間遠心して集菌した後、上澄みを捨て、1 ml の液体 MS 培地で再懸濁した。この懸濁液を、10  $\mu$ M アセトシリンゴンと 10  $\mu$ M メルカプトルエタノールを含む 40 ml の液体 MS 培地に加えて混合し、アグロバクテリウム感染液とした。

#### 1-2-4-3 感染

無菌播種したトマトの子葉の端を 2 mm ほど切り取った後、子葉 1 枚につき 2 枚の切片を得られるよう、葉脈の垂直方向にすばやく切断し、アグロバクテリウム感染液に浸した。100 切片程切り取った後、それらを 15 分間感染液に浸漬した。

#### 1-2-4-4 共存培養

アグロバクテリウムに感染させた子葉切片を滅菌したキムタオルにのせ、表面の余分な感染液を念入りに除いた。その後、共存培地 [MS 培地, 3% スクロース, 0.3% ゲランガム, 10  $\mu$ M アセトシリンゴン, ゼアチン 1.5 mg/l, pH 5.8] に葉の向軸面が培地に接するように置床した。シャーレは光が当たらないようにアルミホイルで包み、25°C

の培養室で、2-3 日間、アグロバクテリウムの増殖具合を見ながら共存培養を行った。

#### 1-2-4-5 カルス誘導

共存培地に並べた子葉切片のまわりにアグロバクテリウムの増殖が確認できたら、葉の向軸側が上になるように切片をカルス誘導培地 [MS 培地, 3% スクロース, 0.3% ゲランガム, ゼアチン 1.5 mg/l, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 100 mg/l, pH 5.8] に移植した。切片の切り口からカルスが形成され、0.5-1 cm 四方の大きさに成長するまで 2 週間おきに培地を新しいものと交換した。

#### 1-2-4-6 シュート誘導

カルスが 0.5-1 cm 四方の大きさまで成長したら、ゼアチンの濃度を下げたシュート誘導培地 [MS 培地, 3% スクロース, 0.3% ゲランガム, ゼアチン 1.0 mg/l, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 100 mg/l, pH 5.8] に移動した。このとき、カルスから子葉切片をメスで切り離した。培地は 2 週間おきに新しいものと交換した。

#### 1-2-4-7 発根選抜

カルスから 1-2 cm のシュートが伸びてきたら、カルスを持ち込まないようにシュートのみをメスで切り出し、シュートを発根選抜培地 [1/2 MS 培地, 3% スクロース, 0.3% ゲランガム, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 100 mg/l, pH 5.8] に挿した。主根だけでなく側根も網状に形成された個体に関しては順化を行った。

#### 1-2-4-8 順化

発根選抜培地で発根した植物体をシャーレから取り出し、5×5×5 cm のロックウールキューブ (Grodan) に移植後、栽培室にて 25°C, 16 時間明期 ( $60.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) で水耕栽培により育成した。初めのうちは湿度を急激に下げないよう植物体にビニール袋をかぶせ、穴を開けながら 3-5 日かけてゆっくりと順化させた。水耕栽培溶液として、大塚ハウス A 処方 [大塚 1 号 1.5 g/l, 大塚 2 号 1 g/l] (大塚化学) を用い、電気伝導度 (EC) を 1.5 dS/m に設定した培養液を使用した。

#### 1-2-5 フローサイトメーターを用いた倍数性の確認

倍数性の確認には核の抽出・染色キット Partec CyStain UV precise P ならびにフィルターPartec 50 µm CellTrics disposable filter, フローサイトメーターはプロイディーアナライザーPA 型 (すべて Partec 社) を用いた.

#### 1-2-5-1 サンプルの調製

0.5 cm 角のトマト本葉切片を準備し, 葉が浸るように Extraction Buffer 400 µl を滴下した. 次にカミソリを用いて葉切片を細かく切断し, 1-5 分間インキュベートすることで裸核の抽出を行った. 抽出液は, 葉断片を除くためフィルターで濾過し, 試験管に集めた. 最後に, Staining Solution 1.6 ml を抽出液に加え, 1 分以上インキュベートしたものをサンプル調製液として分析に用いた.

#### 1-2-5-2 測定

試料の入った試験管をプロイディーアナライザーの試料導入部にセットし, 測定を行った. 測定においては, 二倍体である‘Micro-Tom’の野生型 (WT) の調製液をコントロールとし, フローサイトメーターの各測定条件の設定を行った. ヒストグラム の位置は検知器の感度 (GAIN) を, 精度と分析スピードは試料の流速 (SPEED) を変えることでそれぞれ設定した. また, 細胞残渣によるノイズが生じるため Lower signal level (L-L) を調整し, ノイズ部分を計測しないようにした. フローサイトメーターの結果から二倍体の植物体を選抜した.

### 1-2-6 サザンブロット解析による導入遺伝子のコピー数調査

形質転換体のゲノムに導入された T-DNA のコピー数を調べるため, 以下の手順でサザンブロット解析を行った.

#### 1-2-6-1 トマトゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には Maxwell 16 DNA Purification Kits (Promega) を用いた. WT と形質転換体の若葉約 100-200 mg を 2 ml のエッペンドルフチューブに入れ, 液体窒素で凍結させた後, マイクロペッスルを用いてチューブ内で葉をよく粉砕した. Kit 内の Lysis Buffer が入ったカートリッジに粉砕した葉を入れ, カートリッジを Maxwell 16 にセットし, ゲノム DNA の抽出を行った. 抽出したゲノム DNA は滅菌水 400 µl に溶解

した。

#### 1-2-6-2 制限酵素処理

葉から抽出したゲノム DNA 10  $\mu\text{g}$  を制限酵素 *EcoR* I ( TOYOBO, 50 units/ $\mu\text{l}$  ) により消化した。反応液の組成はゲノム DNA 10  $\mu\text{g}$ , *EcoR* I 5  $\mu\text{l}$ , 10 $\times$ M buffer 30  $\mu\text{l}$  に超純水を加えて計 300  $\mu\text{l}$  とし, 37 $^{\circ}\text{C}$  で 12 時間制限酵素処理を行った。

反応後, 制限酵素の除去とゲノム DNA の濃縮を目的として精製を行った。まず, 反応液にイソプロパノール 300  $\mu\text{l}$  を加え, 静かに混和した後, -30 $^{\circ}\text{C}$  で 20 分以上静置した。その後, 15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間遠心を行い, 上清を捨てた。そこに, 70%エタノール 700  $\mu\text{l}$  を加え, よく混和し, 15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心を行った。遠心分離後, 沈殿を残して上清を除去し, 70 %エタノールがなくなるまで室温で乾燥させた後, 沈殿を超純水 15  $\mu\text{l}$  に溶解した。

#### 1-2-6-3 ゲノム DNA のトランスファー

*EcoR* I で消化したゲノム DNA 15  $\mu\text{l}$  を 5 $\times$ Loading Buffer (TOYOBO) 5  $\mu\text{l}$  と混和し, 0.8 %アガロースゲルと泳動バッファー1 $\times$ TAE 溶液を用い, 全量を 50 V で約 3 時間電気泳動した。泳動後のゲルは, エチジウムブロマイドで染色し, 泳動像を確認した。

続いて, ゲルを 0.25 M HCl 溶液に浸し, 10 分間振とうすることで, 加水分解反応を行った。このとき, Loading Buffer のブロムフェノールブルーの青色が完全に黄色に変わったことを確認した。ゲルを超純水で軽くすすいだ後, 変性溶液 [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl] に浸して振とうを行った。ブロムフェノールブルーが再び青色に戻ったことを確認したら変性溶液を捨て, ゲルを超純水ですすぎ, トランスファーに移った。

トランスファーはダウンワード法 (Chomczynski 1992) により行った。厚さ 5-6 cm になるようキッチンペーパーを重ね, その上に 20 $\times$ SSC に浸した濾紙 (11 $\times$ 10 cm) 2 枚, メンブレン Amersham Hybond-N<sup>+</sup> (GE Healthcare, 11 $\times$  10 cm), ゲル, 20 $\times$ SSC に浸した濾紙 (11 $\times$ 10 cm) 2 枚, スチロール樹脂トレー中の 20 $\times$ SSC に片端が浸る長さの大きな濾紙 (40 $\times$ 11 cm) を順に重ねた。その上に, 重り (約 300 g ) を乗せ, 2 時間トランスファーを行った。トランスファーされたメンブレンを 5 $\times$ SSC で軽く洗浄した後, UV crosslinker を用いて UV 固定 (70000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) を行った。



#### 1-2-6-4 標識プローブの作製

*NPTII* 遺伝子を検出するための標識プローブの作製を行った。PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて PCR を行い、DIG ラベルされたプローブを作製した。テンプレートには *RNAi-SIGADall* のプラスミド DNA (pBI-sense, antisense-GW) を用い、プライマーには *NPTII* 遺伝子の全長を増幅するプライマーセットを用いた (Table 1)。PCR の組成は PCR DIG probe synthesis mix 5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Forward primer 2.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Reverse primer 2.5  $\mu$ l, Enzyme mix 0.75  $\mu$ l, プラスミド DNA (100 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 超純水 33.2  $\mu$ l の計 50  $\mu$ l とし、反応条件は 95 $^{\circ}$ C; 7 分の後, 95 $^{\circ}$ C; 30 秒, 56 $^{\circ}$ C; 30 秒, 72 $^{\circ}$ C; 1 分 30 秒を 35 サイクル行い、最後に 72 $^{\circ}$ C; 7 分の反応を行った。PCR 産物 20  $\mu$ l を新しい PCR チューブに移し、100 $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性させた後、素早く氷入りの 100% エタノールで急冷した。冷却後、High SDS バッファー [7% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 50% (v/v) ホルムアミド, 5 $\times$ SSC, 50 mM sodium phosphate, 2% (w/v) Blocking reagent (Roche), 0.1% (w/v) N-laurylsacrosine] 30 ml と混和し、ハイブリダイゼーションバッファーとした。

#### 1-2-6-5 ハイブリダイゼーション

あらかじめ 60 $^{\circ}$ C に温めておいた High SDS バッファー [7% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulfate), 50% (v/v) ホルムアミド, 5 $\times$ SSC, 50 mM sodium phosphate, 2% (w/v) Blocking reagent (Roche), 0.1% (w/v) N-laurylsacrosine] にメンブレンを浸し、45 $^{\circ}$ C で 30 分間振とうすることでプレハイブリダイゼーションを行った。振とう後、*NPTII* プローブを含むハイブリダイゼーションバッファーにメンブレンを浸し、45 $^{\circ}$ C で 14 時間、再び振とうした。

#### 1-2-6-6 抗 DIG 抗体によるブロッキング

ハイブリダイゼーションしたメンブレンを、2 $\times$ 洗浄バッファー [2 $\times$ SSC, 0.1% (w/v) SDS] に浸し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間、2 回振とうした。さらに、0.1 $\times$ 洗浄バッファー [0.1 $\times$ SSC, 0.1% (w/v) SDS] にメンブレンを浸し、65 $^{\circ}$ C で 20 分間、2 回振とうした。

ブロッキング溶液 [10% (w/v) Blocking reagent] とバッファー1 [0.15 M NaCl, 0.1 M Maleic acid, 7.5 g/l NaOH, pH 7.5] を 1:4 で混合したバッファー2 にメンブレンを浸し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間振とうした。続いて、抗 DIG-アルカリ脱リン酸化酵素 (Roche) をバッ

ファー2 で 1 万倍希釈した抗体溶液中で 37°C, 30 分間メンブレンを振とうした。

#### 1-2-6-7 シグナルの検出

ブロットニングしたメンブレンを, 0.3%の Tween 20 を含むバッファー1 に浸し, 20 分間振とうした。洗浄後, メンブレンをバッファー3 [0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 9.5] になじませた。バッファー3 からメンブレンを出し, CDP-Star Detection Reagent (Roche) を 1%含む 1 ml のバッファー3 をメンブレンの表面に添加し, 乾燥させないようにして 5 分間放置した。メンブレンの余分な液をキムタオルの上で除き, 乾燥させた後, イメージアナライザーLAS 4000 mini (FUJIFILM) を用いてシグナルの検出を行った。

#### 1-2-7 定量的 RT-PCR による果実内 *SIGAD* 遺伝子群の発現解析

作出した形質転換体から緑熟果実 (開花後25-27日) と赤熟果実 (開花後43-45日) をサンプリングし, *SIGAD* 遺伝子群の発現解析を行った。液体窒素を用いて凍結粉碎した果実から, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてTotal RNAを抽出した。抽出の過程ではRNase-Free DNase Set (QIAGEN) によるDNAの分解処理も行った。その後, 抽出したTotal RNA 1 µgとSuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いてcDNAの合成を行った。cDNA合成方法はキット添付のプロトコールに従った。合成したcDNAを10倍希釈し, これを発現解析のテンプレートとして用いた。

*SIGAD* 遺伝子群の発現量の定量にはThermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa) と, SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) を用いた。また, 3つの*SIGAD*遺伝子に対する遺伝子特異的プライマーを, 増幅領域が100-200 bpの長さになるように設計した。プライマーの特異性はPCR増幅産物をシーケンスすることにより確認した。

検量線作成のため, 'Micro-Tom' の WT 果実から合成した cDNA の希釈系列 (5, 10, 100, 1000, 10000 倍に段階希釈したもの) をスタンダード区として, 未知サンプルとともに qRT-PCR を行った。反応液調製, 反応, 検出はスタンダード区を 2 反復, 未知サンプル区を 3 反復行った。プライマーは, 設計した *SIGAD* 遺伝子特異的プライマーと, 内部標準として, *SlUbiquitin* 遺伝子 (accession no. X58253) の一部を特異的に増幅するプライマーセットを用いた (Table 1)。qRT-PCR の組成は 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 µl, 10 µM Forward primer 0.4 µl, 10 µM Reverse primer 0.4 µl, 10 倍希釈した cDNA 1 µl, 超純水 8.2 µl の計 20 µl とし, 反応条件は 95°C; 10 秒の後, 95°C; 5 秒, 54°C; 30 秒を

40 サイクル行った。

解析方法は相対定量の検量線法を用いた。スタンダード区をテンプレートとして *SIGAD* 遺伝子プライマーと *SIUbiquitin* 遺伝子プライマーを用いて得られた増幅量をもとに、それぞれ検量線を作成した。作成した *SIGAD* 遺伝子の検量線から、未知サンプル区の *SIGAD* 遺伝子発現量を算出した。サンプル間の cDNA 濃度の補正は、*SIUbiquitin* 遺伝子の検量線から算出した各サンプル *SIUbiquitin* 遺伝子の増幅量で補正した。未知サンプルの *SIGAD* 遺伝子の増幅量は各未知サンプルの *SIUbiquitin* 遺伝子の増幅量で補正した。

### 1-2-8 果実内 GABA 含量の測定

(1-2-7) と同じ果実サンプルを用い、果実内 GABA 含量を測定した。まず、凍結粉砕したトマト果実 50 mg を 2 ml チューブに測りとり、直径 4.8 mm のビーズと 8 % (w/v) のトリクロロ酢酸 500  $\mu$ l を加え、TissueLyser (QIAGEN) を用いて 20/s で 1 分間混和した。その後、15000 rpm, 4°C で 20 分間遠心分離し、上清 300  $\mu$ l を別の 1.5 ml チューブに移した。そこに 400  $\mu$ l のジエチルエーテルを加え、卓上ミキサーで 10 分間攪拌した後、15000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、再度 400  $\mu$ l のジエチルエーテルを加え、卓上ミキサーで 10 分間攪拌した。15000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離し、上清を取り除いた後、ジエチルエーテルを完全に揮発させるためドラフト内で 1 時間静置した。抽出したアミノ酸は使用するまで -30°C で保存した。

GABA 含量の測定は Jakoby (1962) の方法を参考に行った。果実から抽出したアミノ酸とスタンダード用の GABA の希釈系列 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 nmol/20  $\mu$ l を 20  $\mu$ l ずつ 96 穴マイクロプレートにのせた。そこに 0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 9.0) 142  $\mu$ l, 50 mM 2-メルカプトエタノール 4  $\mu$ l, 50 mM NADP 2  $\mu$ l, 60 mM  $\alpha$ -ケトグルタル酸 2  $\mu$ l を加えた。Ultramark マイクロプレートリーダーを用いて 340 nm の吸光度を測定し、これをバックグラウンドとした。続いて、吸光度を測定したプレートに 24  $\mu$ l の 0.1 M ピロリン酸ナトリウム (pH 9.0) と 0.005 unit/ $\mu$ l に調製した GABase (Sigma) 1  $\mu$ l を加え、37°C で 1 時間反応させた。反応後のプレートを再びマイクロプレートリーダーにセットし、340 nm の吸光度を測定した。反応前後の吸光度の差から NADPH の増加量を算出した。さらに、スタンダードの GABA 希釈系列における NADPH の増加量から検量線を作成し、アミノ酸抽出液の GABA 含量を算出した。

### 1-2-9 葉における GABA およびグルタミン酸含量の測定

22 日齢の植物体から葉をサンプリングし、凍結粉碎後、(1-2-8)と同様の方法でアミノ酸を抽出した。アミノ酸抽出液 30  $\mu\text{l}$  を 1.5 ml チューブに移し、ロータリーエバポレーター (CVE3100, TOKYO RIKAKIKAI) を用いて濃縮・乾固を行った。その後、超純水 300  $\mu\text{l}$  を加えて攪拌し、再度、ロータリーエバポレーター (CVE3100, TOKYO RIKAKIKAI) を用いて濃縮・乾固を行った。この操作を2度繰り返した後、乾固したサンプルに 0.01 N HCl を 300  $\mu\text{l}$  加え、溶出させた。ウルトラフリーMC 0.22  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE) にサンプルを全量移し、4°C, 5000 $\times$ g の条件で溶液が落ち切るまで遠心した。得られたろ液をアミノ酸分析用の試料とし、筑波大学分析センターのアミノ酸分析に委託した。

### 1-2-10 果実内 GAD 酵素活性の測定

緑熟果実 (開花後 25-27 日) をサンプリングし、種子とゼリー組織を除去した後、液体窒素を用いて凍結粉碎した。50 ml チューブに凍結粉碎した果実サンプル 1 g を測りとり、あらかじめ氷上で冷やした抽出バッファー [50 mM Tris-HCl バッファー (pH 8.2), 3 mM dithiothreitol, 1.25 mM EDTA, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 6 mM 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulphonate, 2% w/v polyvinylpyrrolidone, 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pridoxal-5-phosphate, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride and 2.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  leupeptin, pepstatin (Clark et al. 2009b) ] 5 ml を加え、ボルテックスを用いてよく攪拌した。その後、4°C, 10000 $\times$ g の条件で 15 分間遠心分離し、上清を新しい 50 ml チューブに回収した。回収した上清を、4°C, 10000 $\times$ g の条件で再度 15 分間遠心分離した後、上清をアミコンウルトラ-4 (10 kDa, Millipore) に移して、濃縮を行った。その後、PD-10 (GE Healthcare) カラムを用いて脱塩処理を行い、得られた溶出液を GAD の酵素反応に用いる粗抽出タンパク質とした。

GAD の酵素活性は Akama and Takaiwa (2007) および Akihiro et al. (2008) と同様、グルタミン酸を基質に用いた際の GAD 反応による GABA 生産量から算出した。まず、Bradford 法により粗抽出タンパク質の濃度を測定し、サンプル間で濃度が一定 (0.4-0.6  $\text{mg ml}^{-1}$ ) になるよう、超純水で希釈した。続いて、1.5 ml チューブに粗抽出タンパク質を 60  $\mu\text{l}$  ずつ移し、氷上で GAD 反応バッファー [100 mM bis-tris-HCl (pH 7.0), 1mM DTT, 5mM glutamate, 0.5mM pyridoxal-5-phosphate, 0.5mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.1M bovine calmodulin

(Sigma-Aldrich, Missouri) and 10% (v/v) glycerol] 240  $\mu$ lを加えた。タッピングにより素早く攪拌した後、8連のPCRチューブに各サンプルの反応液を50  $\mu$ lずつ回収し、サーマルサイクラーを用いて99°C、10分間の熱処理を行うことで酵素反応を停止させた。これを反応0時間のサンプルとし、-30°Cに保存した。残りの反応液（250  $\mu$ l分）はGAD反応を進めるため、30°Cで3時間インキュベートし、反応0時間のサンプルと同様の熱処理を行った後、-30°Cに保存した。その後、(1-2-8)のGABase法を用い、反応0時間、3時間のサンプル20  $\mu$ lに含まれるGABA含量をそれぞれ定量することで、時間（分）、タンパク質（mg）当たりのGABA生産量（nmol）を求めた。

#### 1-2-11 T<sub>1</sub>世代におけるホモ、ヘテロ、アザイガス個体の選抜

T<sub>0</sub>世代において1コピーの導入遺伝子を保持する個体を自殖すると、T<sub>1</sub>世代では遺伝学的に分離し、導入遺伝子をホモに持つ個体、ヘテロに持つ個体、抜け落ちた個体（アザイガス）が得られる。T<sub>1</sub>世代の若葉からゲノムDNAを抽出し、ゲノムDNAをテンプレートに導入遺伝子の一部を増幅させると、その増幅量からゲノム上に何コピーの導入遺伝子が存在するかを推定することができる。この原理を利用し、以下の方法でホモ、ヘテロ、アザイガス個体の選抜を行った。

##### 1-2-11-1 ゲノムDNAの抽出

(1-2-6-1)と同様に、Maxwell 16 DNA Purification Kits (Promega)を用いて、トマトの若葉からゲノムDNAを抽出した。抽出後は、分光光度計（NanoDrop 2000）を用いてゲノムDNAの濃度を測定した。

##### 1-2-11-2 ゲノミックリアルタイムPCR

ゲノミックリアルタイムPCRには(1-2-7)と同様、Thermal Cycler Dice® Real Time System (TaKaRa)と、SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)を用いた。

検量線作成のため、導入遺伝子がホモ個体であることが既知の植物体から抽出したゲノムDNAの希釈系列（1, 2, 5, 10, 20, 100倍に段階希釈）をスタンダード区として未知サンプルとともにPCRを行った。反応液調製、反応、検出はスタンダード区、未知サンプル区ともに2反復行った。プライマーは、*NPTII*遺伝子の一部を増幅するプライマーセットと、内部標準として、トマト内生遺伝子でゲノム中に1コピー存在

することが知られている tomato ascorbate peroxidase, *APX* 遺伝子 (GenBank acc. no. Y16773) の一部を増幅するプライマーセットを用いた (Table 1). qRT-PCR の組成は 2×SYBR® Premix Ex Taq™ II 10 µl, 10 µM Forward primer 0.4 µl, 10 µM Reverse primer 0.4 µl, 10 倍希釈した cDNA 1 µl, 超純水 8.2 µl の計 20 µl とし, 反応条件は 95°C; 10 秒の後, 95°C; 5 秒, 60°C; 30 秒を 40 サイクル行った.

解析方法は相対定量の検量線法を用いた. スタンダード区をテンプレートとして *NPTII* 遺伝子プライマーと *APX* 遺伝子プライマーを用いて得られた増幅量をもとに, それぞれ検量線を作成した. 作成した *NPTII* 遺伝子の検量線から, 未知サンプル区の *NPTII* 遺伝子の増幅量を算出した. サンプル間のゲノム DNA 濃度の補正には, *APX* 遺伝子の検量線から算出した各未知サンプルの *APX* 遺伝子の増幅量で補正した. 未知サンプルの *NPTII* 遺伝子の増幅量は各未知サンプルの *APX* 遺伝子の増幅量で補正した. さらに, *APX* 遺伝子の増幅量を 1 としてゲノム DNA 量を補正し, *NPTII* 遺伝子の増幅量を相対定量した. 未知サンプルの *NPTII* 遺伝子の増幅量が 1 に近い値であればホモ個体, 0.5 に近い値であればヘテロ個体, 0 に近い値であればアザイガス個体であると判断した.

### 1-2-12 T<sub>2</sub>あるいは T<sub>3</sub>世代における植物体の栽培条件

プラスチックシャーレにペーパータオルを敷きつめ, 蒸留水で十分に湿らせた上に種子を置いた. 子葉が展開したら 5×5×5 cm のロックウールキューブ (Grodan) に移植し, 植物工場の苗テラス (太洋興業) にて明期 25°C /暗期 20°C, 16 時間明期 (450 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), CO<sub>2</sub> 濃度 600 ppm 条件で水耕栽培により育成した. 灌水は 1 日 1 回とし, 明期開始の午前 8 時に ebb and flow 方式の底面給水で液肥を与えた. 液肥には大塚ハウス A 処方 [大塚 1 号 1.5 g/l, 大塚 2 号 1 g/l] (大塚化学) を用い, 電気伝導度 (EC) は 1.5 dS/m に設定した.

## 1-3 結果

### 1-3-1 *SIGAD* 遺伝子発現抑制形質転換体の作出

*SIGAD* 遺伝子の発現がトマト果実における GABA の生合成にどの程度寄与しているかを調査するため, RNAi 法を用いて *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の発現を特異的に抑制する形質転換体 (*RNAi-SIGAD1*, *-SIGAD2*, *-SIGAD3*) と 3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現を同

時に抑制する形質転換体 (*RNAi-SIGADall*) の作出を試みた。トマトの形質転換にはアグロバクテリウム法を用い、各コンストラクトに関して約 500 の子葉切片を供試した。抗生物質のカナマイシンを含む選抜培地において再分化した植物体を形質転換体の候補とし、その中から二倍体の個体のみを選抜した。さらに、*NPTII* 遺伝子特異的プローブを用いてサザンブロット解析を行い、導入遺伝子のコピー数を調査した。その結果、*RNAi-SIGAD1* に関しては 8 系統 (2, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14) , *RNAi-SIGAD2* に関しては 4 系統 (3, 7, 10, 11) , *RNAi-SIGAD3* に関しては 7 系統 (2, 4, 5, 6, 8, 10, 15) , *RNAi-SIGADall* に関しては 4 系統 (1, 5, 7, 8) が導入遺伝子を 1 コピー保持していることが確認された (Fig. 4) . 続いて、各形質転換体について導入遺伝子の効果をおおまかに把握するため、 $T_0$  世代の果実内 GABA 含量を GABase 酵素アッセイにより測定した。先行研究においてトマト果実内の GABA 含量は緑熟期に最大に達し、ブレイカーステージを境に急激に減少することが報告されている (Rolin et al. 2000; Akihiro et al. 2008) . そこで、本実験では GABA が高蓄積する緑熟期の果実と GABA が減少した後の赤熟期の果実を供試した。まず *RNAi-SIGAD1* に関しては、系統 14 の赤熟果実において WT の 2.8 倍高い GABA 含量がみられたものの、他の系統は緑熟果実、赤熟果実ともに WT と比較して顕著な差は見られなかった (Fig. 5A) . 一方、*RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3*, *RNAi-SIGADall* に関しては WT と比較して GABA 含量の減少傾向がみられた。例えば、*RNAi-SIGAD2* に関しては 5 系統において GABA 含量の低下がみられ、その含量は緑熟果実で WT の 37-59%、赤熟果実で WT の 23-72%であった (Fig. 5B) . また、5 系統の *RNAi-SIGAD3* および 4 系統の *RNAi-SIGADall* ではさらに強い GABA 含量の低下がみられ、その含量は緑熟果実で WT の 5-28%、赤熟果実で WT の 7-36%であった (Fig. 5C, D) . これらの結果から、トマト果実において *SIGAD2* および *SIGAD3* の発現量と GABA 含量との間には関連性があることが示唆された。

そこで、 $T_0$  世代において果実内 GABA 含量の減少傾向がみられた *RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3*, *RNAi-SIGADall* に関しては、その傾向が導入遺伝子に起因するかを調査するため、導入遺伝子を 1 コピー保持する独立系統を 2 または 3 系統ずつ自殖し、得られた  $T_2$  あるいは  $T_3$  世代の個体を用いて再度解析を行った。本実験では導入遺伝子の効果を評価するため、導入遺伝子をホモにもつ個体 (HO) をコントロールのアザイガス (AZ) 個体 (HO 個体と同じ  $T_0$  植物に由来するが、自殖により遺伝的に分離した結果、導入遺伝子が抜け落ちた個体) または WT と比較した。まず、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) に

より、各系統において RNAi 標的遺伝子の発現が抑制されているかを調査した。サンプルには T<sub>0</sub> 世代と同様、緑熟果実および赤熟果実を用い、WT の緑熟果実における発現量を 1 としたときの相対値を算出した。T<sub>2</sub> 世代の *RNAi-SIGAD2* では、RNAi の標的となった *SIGAD2* の発現が 2 系統の HO 個体 (3-HO, 8-HO) においてコントロールの WT や AZ と比較して有意に抑制されていることが確認された。その値は緑熟果実で WT の 14-25%、赤熟果実では 22-32%程であった (Fig. 6A, C)。一方、各 HO 個体に対応する AZ 個体 (3-AZ, 8-AZ) は緑熟果実で WT の 70-110%、赤熟果実では WT の 98-129%と、WT と同程度の発現量を示した (Fig. 6A, C)。続いて、同じ果実サンプルを用いて GABA 含量の測定を行った。T<sub>2</sub> 世代 *RNAi-SIGAD2* の HO 個体における果実内 GABA 含量は WT よりも有意に低い結果となり、その含量は緑熟果実で WT の 50-81%、赤熟果実では WT の 25-61%程であった (Fig. 6B, D)。系統 3-AZ では緑熟果実、赤熟果実ともに WT よりも有意に低い GABA 含量を示したが、対応する HO 個体 (3-HO) と比較するとその含量は依然として高かった。

同様の実験を T<sub>2</sub> 世代の *RNAi-SIGAD3* と T<sub>3</sub> 世代の *RNAi-SIGADall* について行った。*RNAi-SIGAD3* に関しては、RNAi の標的となった *SIGAD3* の発現量が 2 系統の HO 個体 (5-HO, 8-HO) で顕著に抑制された。その値は緑熟果実で WT の 4-6%、赤熟果実では WT の 8-23%であった (Fig. 7A, C)。一方、対応する AZ 個体の *SIGAD3* の発現量は緑熟果実、赤熟果実いずれにおいても WT と同程度であった。果実内 GABA 含量は *SIGAD3* の発現量と強い相関がみられ、2 系統の HO 個体 (5-HO, 8-HO) の GABA 含量は WT よりも有意に低くなった。その含量は緑熟果実で WT の 8-10%、赤熟果実では WT の 8-9%であった (Fig. 7B, D)。一方、AZ 個体では *SIGAD3* の発現と同様、緑熟果実、赤熟果実いずれにおいても WT と同程度か、対応する HO 個体よりも高い GABA 含量を示した (Fig. 7B, D)。*RNAi-SIGADall* に関しては 3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現が 3 系統の HO 個体 (1-HO, 7-HO, 8-HO) において劇的に抑制されていた。3 系統の HO 個体の緑熟果実における *SIGAD1* の発現量は WT の 2-5%、*SIGAD2* の発現量は WT の 3-5%、*SIGAD3* の発現量は WT の 5-12%であった (Fig. 8A)。同様に、赤熟果実における *SIGAD1*、*SIGAD2*、*SIGAD3* の発現量はそれぞれ WT の 13-25%、5-8%、8-23%であった (Fig. 8C)。一方、AZ 個体における 3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現量は緑熟果実、赤熟果実いずれにおいても WT と同程度であるか、対応する HO 個体よりも高い値であった。また、3 系統の HO 個体では果実内 GABA 含量も強く抑制されており、その含量は緑熟果実で WT の 5-10%、赤熟



果実では WT の 3-9%を示した (Fig. 8B, D) . 一方, AZ 個体の GABA 含量は WT と同程度であるか, 対応する HO 個体よりも高い値であった.

続いて, *RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3* および *RNAi-SIGADall* の緑熟果実を用いて GAD 活性の測定を行った. その結果, *RNAi-SIGADall* の HO 個体では WT や AZ 個体と比較して GAD 活性の強い抑制がみられた (Fig. 9A) . また, *RNAi-SIGAD2* の HO 個体においても GAD 活性の低下がみられ, その傾向は系統 3-HO において特に顕著であった (WT の 2.7%, Fig. 9B) . また, *RNAi-SIGAD3* に関しては *RNAi-SIGAD2* ほどの強い抑制はみられなかったものの, HO 個体において WT や AZ 個体よりも低い GAD 活性がみられた (Fig. 9C) .

以上の結果をまとめると,  $T_0$  世代で果実内 GABA 含量の減少傾向がみられた *RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3*, *RNAi-SIGADall* では, 後代の解析において, いずれも導入遺伝子を保持しないコントロール (WT または AZ) と比較して, 導入遺伝子を保持する HO 個体では RNAi 標的遺伝子の発現抑制と GAD 活性, GABA 含量の低下がみられた. このことから, *RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3*, *RNAi-SIGADall* で生じた GABA 含量の低下は *SIGAD* 遺伝子の効果的な発現抑制とそれに付随する GAD 活性の低下に起因することが示唆された. また, *RNAi-SIGAD1* に関しては  $T_0$  世代の赤熟果実 (WT で *SIGAD1* が発現する時期) において *SIGAD1* の発現抑制が確認されたものの, GABA 含量との間に正の相関はみられなかった (Fig. 10) . そのため, *RNAi-SIGAD1* に関しては後代での解析は実施しなかった.

### 1-3-2 *SIGAD3* 過剰発現形質転換体の作出

(1-3-1) の RNAi 実験において, *RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3*, *RNAi-SIGADall* 個体では果実内 GABA 含量が WT よりも有意に減少する傾向がみられた. その中でも *RNAi-SIGAD3* は 3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現を全て抑制した *RNAi-SIGADall* と同等の GABA 含量の減少がみられたことから, トマト果実における GABA 蓄積には *SIGAD3* の発現量が大きく寄与しているのではないかと考えた. そこで, トマト果実における *SIGAD3* 発現の重要性をさらに評価するため, *SIGAD3* に関しては CaMV 35S プロモーターを用いた過剰発現体の作出を行った. トマトへの形質転換は (1-3-1) と同様, アグロバクテリウム法を用いて行い, 二倍体である形質転換体候補を 11 系統選抜した. その後, *NPTII* プロンプを用いてサザンブロット解析を行った結果, 5 系統 (5, 6, 7, 10, 11) が

導入遺伝子を 1 コピー保持する個体であることが明らかとなった (Fig. 11) .  $T_0$  世代の解析において、系統 6 と系統 7 で比較的高い果実内 GABA 含量がみられたため (緑熟果実, 赤熟果実において WT の 1.5-2 倍の含量; data not shown) , この 2 系統に関しては自殖を行い,  $T_2$  世代において再度解析を行った. 本実験においても導入遺伝子の効果を評価するため, 導入遺伝子を保持する HO 個体と導入遺伝子を保持しないコントロール (AZ, WT) 個体で比較を行った. また, 果実サンプルには緑熟果実と赤熟果実を供試した. まず, *SIGAD3* の発現量を測定した結果, 2 系統の HO 個体 (6-HO, 7-HO) では WT と比較して有意に発現量が増加しており, その値は緑熟果実で WT の 20-38 倍, Red 果実では WT の 203-280 倍であった (Fig. 12A, C) . 一方, AZ 個体の *SIGAD3* 発現量は WT と同程度であった. また, 2 系統の HO 個体の GABA 含量は *SIGAD3* の発現量と相関するように有意に増加しており, その値は緑熟果実で WT の 2.7-3.3 倍, 赤熟果実では WT の 4.0-5.2 倍であった (Fig. 12B, D) . 一方, AZ 個体の GABA 含量は緑熟果実, 赤熟果実ともに WT と同程度であった. 以上の結果より, トマト果実において *SIGAD3* の発現量と GABA 含量との間には強い相関がみられることが示唆された.

### 1-3-3 *SIGAD* 遺伝子発現抑制体および *SIGAD3* 過剰発現体の形質調査

(1-3-1) の *SIGAD* RNAi 実験および (1-3-2) の *SIGAD3* 過剰発現実験において GABA 含量の異なる組換えトマトが複数系統得られた. 果実内 GABA 含量が最も低下した *RNAi-SIGADall* と果実内 GABA 含量が増加した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* に関しては葉における GABA 含量の定量も行った. その結果, 葉においても果実と同様, *RNAi-SIGADall* の HO 個体では GABA 含量の著しい減少がみられ (Fig. 13A), 反対に *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* では GABA 含量の増加がみられた (Fig. 13B) . しかしながら, いずれの系統においても植物体や果実の発達には大きな異常がみられなかった (Figs. 14, 15) . *RNAi-SIGADall* の HO 個体, AZ 個体, WT についてそれぞれ到花日数, 草丈, 葉枚数, 果実重を調査したところ, 全ての測定項目においていくつかの HO 個体で WT と有意差が認められたものの (Table 2) , いずれも 3 系統の HO 個体で共通するものではなかった. また, *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* についても同様の調査を行った結果, 草丈, 葉枚数に関しては 6-HO 個体で WT と有意差がみられたが, 7-HO では有意差は認められなかった (Table 3) . 一方, 到花日数は 2 系統の HO 個体において WT と有意差がみられたが, 6-HO に関しては, 対応する AZ 個体 (6-AZ) との間には有意差は認められなかった.

#### 1-4 考察

様々な生物種において GAD は GABA 生合成の鍵酵素であると考えられている (Akbarian and Huang 2006; Bouche and Fromm 2004a; Komatsuzaki et al. 2008) . 筆者の所属研究室では先行研究において、トマト ‘Micro-Tom’ の果実から 3 つの GAD 遺伝子ホモログ (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) を単離しており、その中でも *SIGAD2* および *SIGAD3* の発現パターンが果実発達過程でみられる GABA 含量の増加時期と一致することを明らかにしている (Akihiro et al. 2008) . 本章では、先行研究において単離された 3 つの *SIGAD* 遺伝子が、実際にトマト果実内で GABA の生合成に関与しているかを調査することを目的とし、RNAi 法を用いて各 *SIGAD* 遺伝子の発現を個別に抑制する形質転換体 (*RNAi-SIGAD1*, *-SIGAD2*, *-SIGAD3*) と、3 つの *SIGAD* 遺伝子全ての発現を同時に抑制する形質転換体 (*RNAi-SIGADall*) を作出した. その結果、*RNAi-SIGADall* の果実では、3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現がコントロール (WT, AZ) の果実と比較して有意に抑制されており、それに付随して GABA 含量も WT の 10%以下にまで著しく減少した (Fig. 8) . このことから、トマト果実における GABA の生合成は他の生物種と同様、GAD 酵素によるグルタミン酸の脱炭酸反応が主要な経路であると考えられた. また、果実内 GABA 含量の減少傾向は *RNAi-SIGAD2* と *RNAi-SIGAD3* においても認められ (Figs. 6, 7) , 特に *RNAi-SIGAD3* では *RNAi-SIGADall* と同程度の強い減少がみられた (Figs. 7, 8) . 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* と *SIGAD3* が主に働いている可能性が示唆された. また、緑熟果実における GAD 活性は *RNAi-SIGAD3* よりも *RNAi-SIGAD2* において強い抑制がみられたにも関わらず、GABA 含量は *RNAi-SIGAD2* よりも *RNAi-SIGAD3* において顕著に減少した (Figs. 6, 7, 9) . このことから、果実内 GABA 含量は GAD 活性よりも *SIGAD* 遺伝子の発現量と強く相関することが示唆された.

*SIGAD3* 発現量と果実内 GABA 含量との強い相関関係は、*SIGAD3* の過剰発現体においても観察され、*SIGAD3* の発現増加に伴って果実内 GABA 含量が WT の 2.7-5.2 倍に有意に増加した (Fig. 12) . このことから、*SIGAD3* の発現は果実内 GABA 含量に大きな影響を及ぼす重要な律速因子であることが示唆された. 一方、*SIGAD1* に関しては T<sub>0</sub> 世代の *RNAi-SIGAD1* 個体において、WT と比較して顕著な差は見られず (Fig. 5) , *SIGAD1* の発現量と GABA 含量との間に正の相関はみられなかった (Fig. 10) . 先行研究において、*SIGAD1* は果実内 GABA 含量が減少する成熟期に主に発現することが明らかにされて

いる (Akihiro et al. 2008) . これらを考慮すると, 通常の栽培条件では, トマト果実内の GABA 生合成における *SIGADI* の貢献度は他の 2 つの *SIGAD* 遺伝子と比較すると低いと考えられた.

様々な植物種において, 細胞内に過剰な GABA が蓄積することにより植物体の生長や発達に異常が生じることが報告されている. 例えば, C 末の伸長領域を切除した *GAD* を過剰発現させたタバコやイネの研究例では, GABA の高蓄積化に伴い, 植物体の矮化, 葉の白色化, 不稔などの形質が生じることが知られている (Baum et al. 1996 ; Akama and Takaiwa 2007). また, シロイヌナズナの GABA-T 欠損変異体では GABA が高蓄積し, 花粉管伸長に異常がみられるほか, 高濃度の外生 GABA にさらすことで主根や胚軸の細胞伸長が阻害される (Palanivelu et al. 2013; Renault et al. 2011) . また, 筆者所属研究室の先行研究において作出された *SIGABA-T* の RNAi 形質転換体では GABA 含量の増加と共に, 矮化や不稔といった形質が観察された (Koike et al. 2013) . これらの知見は, 植物において GABA の代謝, もしくは GABA 自体がある種の生理応答に関与していることを示している. 本章では果実と葉において GABA 含量が有意に減少 (*RNAi-SIGADall*) あるいは増加 (*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*) した形質転換体を得ることができたため, これらの系統の形質を解析することで, トマトにおける GABA の生理機能を明らかにする手がかりが得られると考えた. しかしながら, これらの系統と非組換え体の植物体や果実の形態には大きな差異がみられなかった (Fig. 14, 15) . 到花日数, 草丈, 葉枚数, 果実重を調査した中で, *RNAi-SIGADall* ではいくつかの HO 個体で WT と有意差がみられたが (Table 2) , いずれも 3 系統の HO 個体に共通してみられる変化ではなかった. 仮に『GABA 含量の減少』がある表現型に影響を及ぼすのであれば, GABA 含量の減少が認められた 3 系統の HO 個体全てにおいて, 共通して変化すると考えられる. そのため, 今回数系統の HO 個体のみで認められた WT との有意差は, 『GABA 含量の減少』ではなく, 遺伝子組換えの際に生じた培養変異等の影響によると考えられた. また, *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* に関しても同様で, 系統 6-HO において草丈や葉枚数に WT と有意差がみられたが, 系統 7-HO では有意差はみられなかった. 一方, 到花日数は 2 系統の HO 個体 (6-HO, 7-HO) に共通して WT よりも有意に遅れる傾向がみられた (Table 3) . しかしながら, 系統 6-HO に関しては対応する AZ 個体 (6-AZ) においても WT と有意差がみられ, 系統 6-HO と系統 6-AZ との間では有意差は認められなかった. 系統 6-AZ

は WT と同等の GABA 含量を示すことから、HO 個体でみられた開花日の遅れは『GABA の増加』に起因するというよりは、培養変異等の影響が大きいと考えられる。つまり、*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* において、過剰に蓄積された GABA は植物体と果実の発達にほとんど影響を及ぼさなかったと推察される。GABA を過剰蓄積させたイネやタバコ (Baum et al. 1996 ; Akama and Takaiwa 2007) とは異なる結果となった理由について以下の可能性が考えられる。まず栄養器官に関しては、*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* で増加した GABA 含量が表現型の変化を引き起こすのに不十分であった可能性がある。実際に、葉の白色化がみられた組換えイネでは葉における GABA 含量が  $29 \mu\text{mol gFW}^{-1}$  であったのに対し (Akama and Takaiwa 2007) 、本研究で作出した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* では  $14 \mu\text{mol gFW}^{-1}$  と、約半量であった (Fig. 13B) 。一方、*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* の緑熟果実では  $30\text{--}36 \mu\text{mol gFW}^{-1}$  の GABA 蓄積がみられ (Fig. 12B) 、この含量は先行研究でタバコやイネの栄養器官 (葉、茎、根) に異常を引き起こしたレベルを上回っていた (Akama and Takaiwa 2007) 。それにも関わらず *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* の果実において異常が観察されなかったのは、器官によって GABA の蓄積能力に差があるためかもしれない。また、GABA レベルに対する感受性が組織・器官により異なる可能性も除外できない。非ストレス条件において、栄養器官の GABA 含量は低いことが知られているが (Satya-Narayan and Nair 1990) 、トマト果実は発達過程で GABA 蓄積量を大幅に変動させる。そのため、トマト果実には潜在的に高い GABA 蓄積能力が備わっている可能性がある。また、最近の研究で、液胞化が進んだトマト果実の中果皮細胞では GABA は主に液胞に貯蔵されるのではないかという仮説が立てられ、実際に液胞膜上でグルタミン酸/アスパラギン酸/GABA を輸送するトランスポーター (SICAT9) が同定された (Snowden et al. 2015) 。このことから、細胞質と液胞間の GABA の輸送能力や GABA の細胞内局在の違いが各器官における GABA への感受性の違いに影響を及ぼしている可能性がある。

また、先行研究において実施された *SIGABA-T* の機能解析では、*SIGABA-T3* の発現が抑制された個体において著しい矮化症状が観察された (Koike et al. 2013) 。この形質は葉や茎における GABA 含量の増加を伴っていたことから、GABA の過剰蓄積による影響と考えられた。しかしながら、他のアイソフォームの発現が同時に抑制されているか否かによって GABA 含量の増加程度には大きなばらつきがみられた。それにも関わらず、矮化の程度は個体間で大きな差はみられなかったことから、*SIGABA-T3* の発現抑制体でみられた矮化症状は単純な GABA の含量による影響ではなく、GABA の代謝が阻害された

ことによる影響と考えることもできるかもしれない。トマト果実において同定されている3つのSIGABA-Tアイソフォームは細胞内においてそれぞれミトコンドリア、細胞質、プラスチドに局在することが明らかにされおり (Clark et al. 2008b) , 異なる細胞小器官で異なる代謝制御に関わっている可能性が考えられる。従って、GABA の代謝が行われる場所 (細胞小器官、植物組織) やその生理的な役割の違いによって、阻害された際に生じる影響は異なるのかもしれない。

本章では、トマト果実における GABA の生合成には *SIGAD2* と *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与えることを明らかにした。それと同時に、トマトにおける GABA の生理機能を明らかにする上で活用できると考えられる、異なる GABA 含量を有する組換えトマト系統を複数作出することができた。しかしながら、これらの系統の植物体や果実の形態からはトマトにおける GABA の生理機能を明らかにする手がかりは得られなかった。そこで第2章では、果実内 GABA 含量が特に強く抑制されていた *RNAi-SIGADall* 系統を材料に用いて、『一次代謝物』に着目し、トマト果実における GABA の役割を探求することとした。

**Table 1** 使用したプライマーリスト

Used for	Primer name	Primer sequence (5'→3')
Vector construction of <i>RNAi-SIGAD1</i>	<i>SIGAD1</i> -1,526F <i>SIGAD1</i> -1,849R	GAGGAAGTGC GTGATGACAA TTATGCCCGGATTGATTCAT
Vector construction of <i>RNAi-SIGAD2</i>	<i>SIGAD2</i> -1,529F <i>SIGAD2</i> -1,840R	GCATGGAAGAAGTTTGTGCT TGAAACAAGGTGACATGACATTA
Vector construction of <i>RNAi-SIGAD3</i>	<i>SIGAD3</i> -1,305F <i>SIGAD3</i> -1,605R	CATGTTACAGTGTTGCGCGTT CACATTTTTTATAATTAATAC
Vector construction of <i>RNAi-SIGADall</i>	<i>SIGAD2</i> -283F <i>SIGAD2</i> -424R	CAGAATGTGACAAATTGAT AGTTTCTCCATCTTCAAGTGG
Vector construction of 35S- <i>SIGAD3-NOS</i> <sup>OX</sup>	<i>SIGAD3</i> -75F <i>SIGAD3</i> -1,529R	ATGGTTCTCTCAAAAACCTCTTCTG CTAACAAATAGATGCTTTCCTAGCT
Creation of probe for southern blot analysis	<i>NPTII</i> -F1 <i>NPTII</i> -R1	ATGATTGAACAAGATGGATTGCAC TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG
qRT-PCR of the internal control	<i>SU</i> ubiquitin-F <i>SU</i> ubiquitin-R	CACCAAGCCAAAGAAGATCA TCAGCATTAGGGCACTCCTT
qRT-PCR of <i>SIGAD1</i>	<i>SIGAD1</i> -12F <i>SIGAD1</i> -117R	AAACTTCCCATTTCCTCAACC CGATTGATCGGAGGAGAAAA
qRT-PCR of <i>SIGAD2</i>	<i>SIGAD2</i> -35F <i>SIGAD2</i> -139R	CTTTGATCTTCTCCGTCGTTG ATATCGAGACGCGAAAGTCG
qRT-PCR of <i>SIGAD3</i>	<i>SIGAD3</i> -1,150F <i>SIGAD3</i> -1,259R	CAGGACGTTTCAATATAATC CCTACGGAGGGTCTCAGAG
Genomic real-time PCR of <i>APX</i>	<i>APX</i> -F <i>APX</i> -R	TTTTACTTGTATATTCGAAGTGTGCCA ACAAC TGCAAATTAGAATCTAGTTGGTA
Genomic real-time PCR of <i>NPTII</i>	<i>NPTII</i> -F2 <i>NPTII</i> -R2	CCGGCTACCTGCCCATTC CGACAAGACCGGCTTCCAT

**Table 2** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall* における植物体と果実の特性調査

	WT	1-HO	1-AZ	7-HO	7-AZ	8-HO	8-AZ
Days to flowering <sup>a</sup>	30.3±0.2	29.5±0.2 *	31.0±0.3	30.2±0.3	30.0±0.4	30.7±0.3	30.8±0.4
Plant height (cm) <sup>a</sup>	5.5±0.2	5.7±0.2	5.4±0.2	4.4±0.1 **	4.0±0.2 **	6.9±0.2 **	6.9±0.2 **
Number of leaves (plant) <sup>a</sup>	6.7±0.2	5.7±0.2 **	5.8±0.3 *	6.3±0.2	6.3±0.2	6.2±0.3	6.3±0.3
Fruit weight (g FW) <sup>b</sup>	2.6±0.2	2.8±0.2	2.2±0.1	4.1±0.2 **	2.7±0.2	3.1±0.2 *	3.0±0.1

草丈 (Plant height) と葉枚数 (Number of leaves) は第一花の開花日に計測した  
果実重 (Fruit weight) は開花後 45 日目の Red 果実を計測した

<sup>a</sup> 値は平均値±SE (n=6)

<sup>b</sup> 値は平均値±SE (n=25)

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す  
(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01).



**Table 3** T<sub>2</sub>世代の 35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>における植物体と果実の特性調査

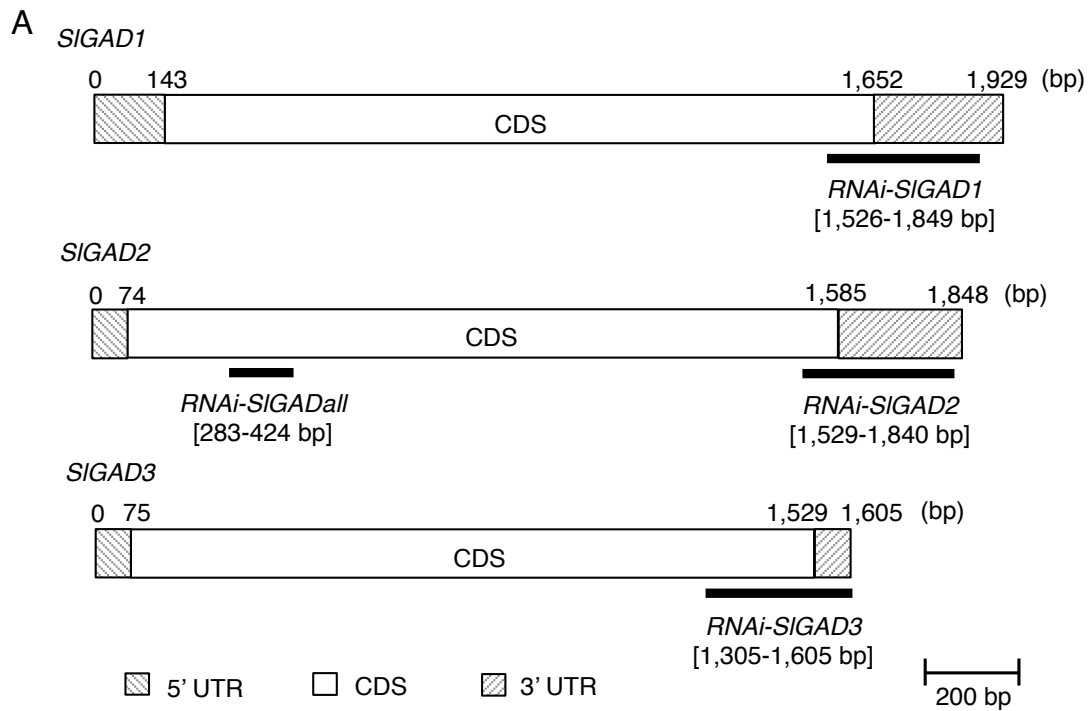
	WT	6-HO	6-AZ	7-HO	7-AZ
Days to flowering <sup>a</sup>	31.0±0.0	32.3±0.4 *	32.3±0.6 *	32.8±0.2 **	30.3±0.4
Plant height (cm) <sup>a</sup>	4.5±0.2	5.5±0.4 *	4.8±0.2	4.2±0.1	4.3±0.2
Number of leaves (/plant) <sup>a</sup>	5.4±0.2	6.3±0.2 **	5.8±0.3	5.8±0.2	5.7±0.3
Fruit weight (g FW) <sup>b</sup>	2.6±0.2	2.5±0.1	3.9±0.2 **	2.6±0.2	2.4±0.1

草丈 (Plant height) と葉枚数 (Number of leaves) は第一花の開花日に計測した  
果実重 (Fruit weight) は開花後 45 日目の Red 果実を計測した

<sup>a</sup> 値は平均値±SE (n=6)

<sup>b</sup> 値は平均値±SE (n=25)

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す  
(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01).



**B**

RNAi-targeted regions	<i>SIGAD1</i>	<i>SIGAD2</i>	<i>SIGAD3</i>
<i>RNAi-SIGAD1</i>	100.0 % (324 nt)	47.6 % ( 6 nt)	34.6 % ( 7 nt)
<i>RNAi-SIGAD2</i>	47.1 % ( 6 nt)	100.0 % (312 nt)	26.1 % ( 8 nt)
<i>RNAi-SIGAD3</i>	42.4 % ( 11 nt)	53.1 % ( 14 nt)	100.0 % (301 nt)
<i>RNAi-SIGADall</i>	76.2 % ( 17 nt)	100.0 % (143 nt)	86.9 % ( 26 nt)

**Fig. 2 RNAi 標的 DNA 配列の設計**

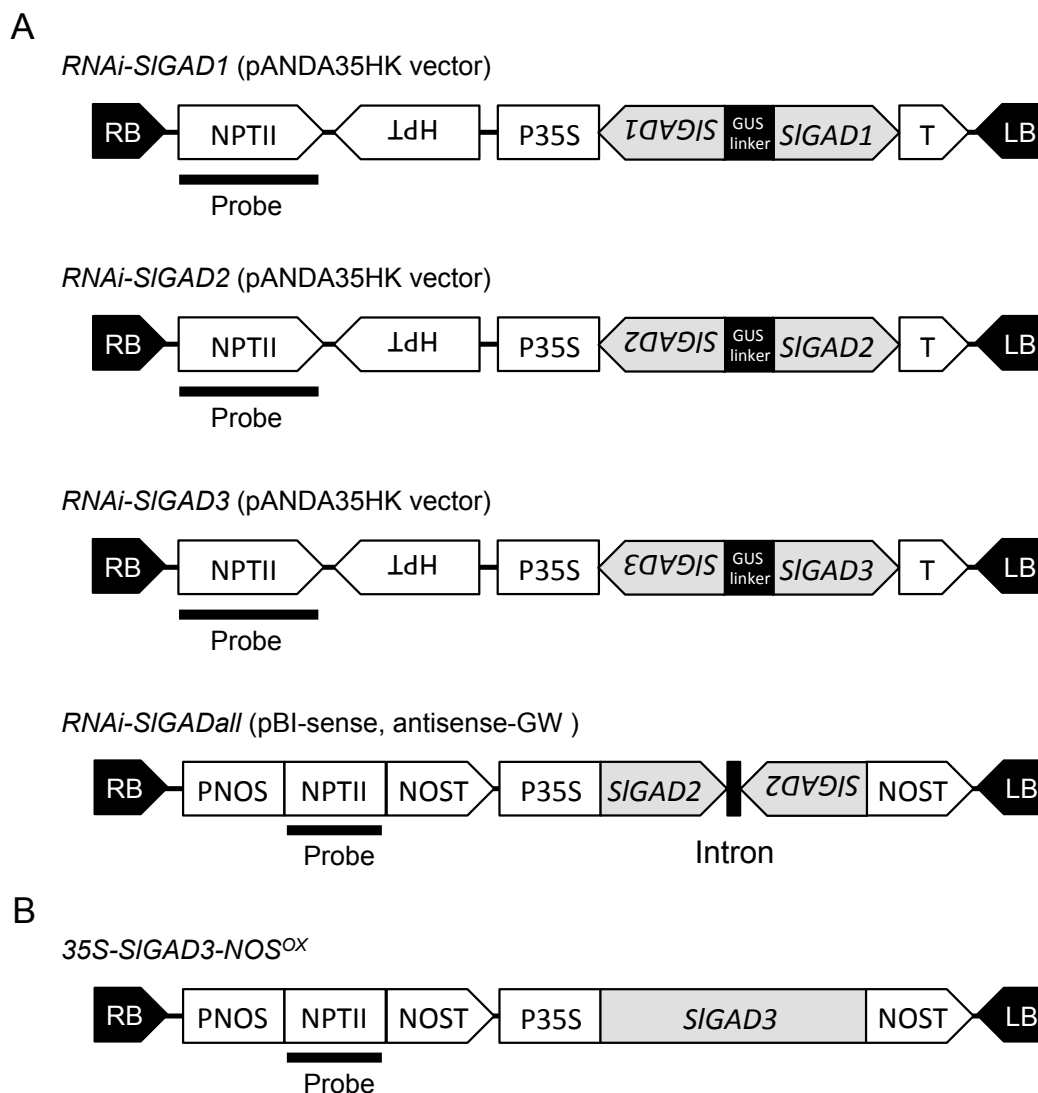
A. *SIGAD* 遺伝子の cDNA 配列の略図. 黒いバーはそれぞれ *RNAi-SIGAD1*, *-SIGAD2*, *-SIGAD3*, *-SIGADall* に

用いた RNAi 標的 DNA 配列の位置を示す.

B. RNAi 標的 DNA 配列とその位置に対応する *SIGAD* 遺伝子間のヌクレオチドの相同性. 連続して完全に

一致するヌクレオチドの最大長を括弧内に示した

UTR, untranslated region; CDS, coding sequence; nt, nucleotide.

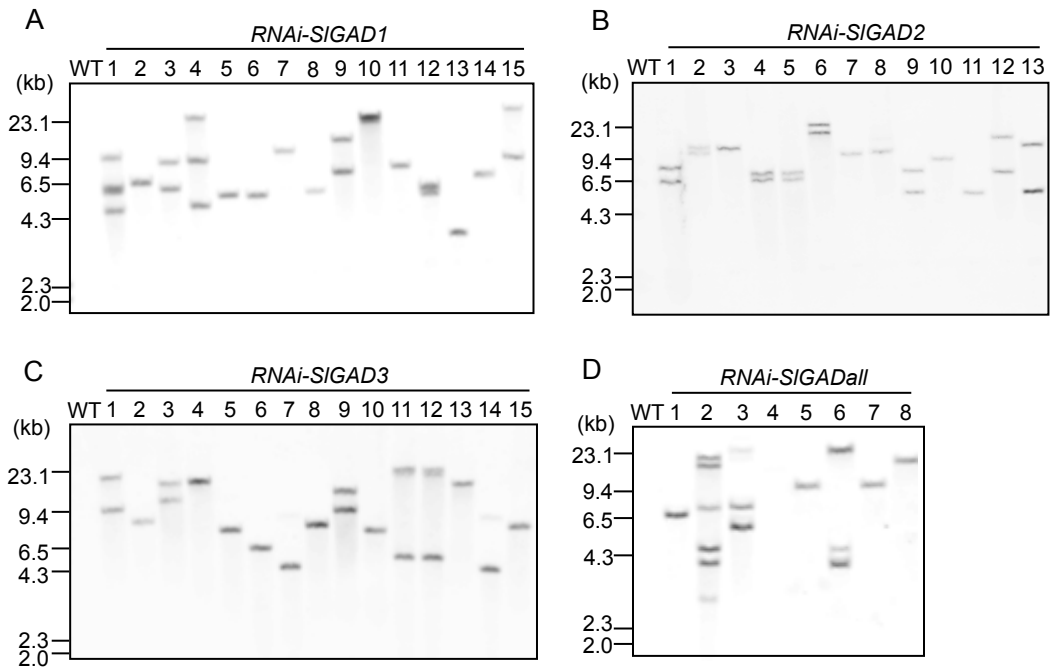


**Fig. 3** *SIGAD* 発現抑制体および *SIGAD3* 過剰発現体の作出に用いたコンストラクト

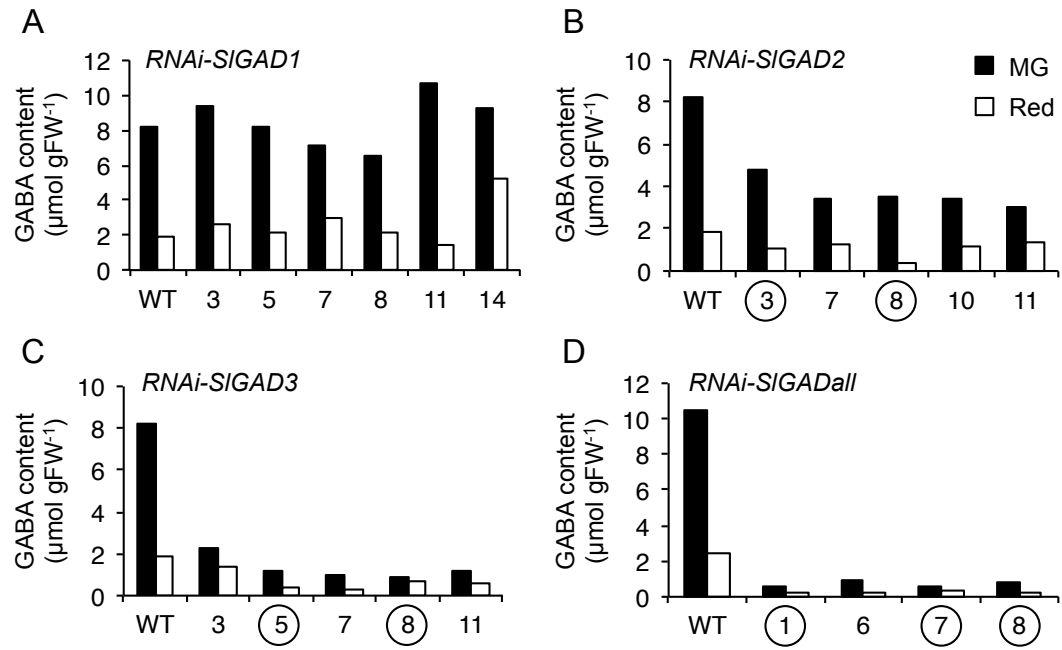
A. *SIGAD* RNAi 用コンストラクト

B. *SIGAD3* 過剰発現用コンストラクト

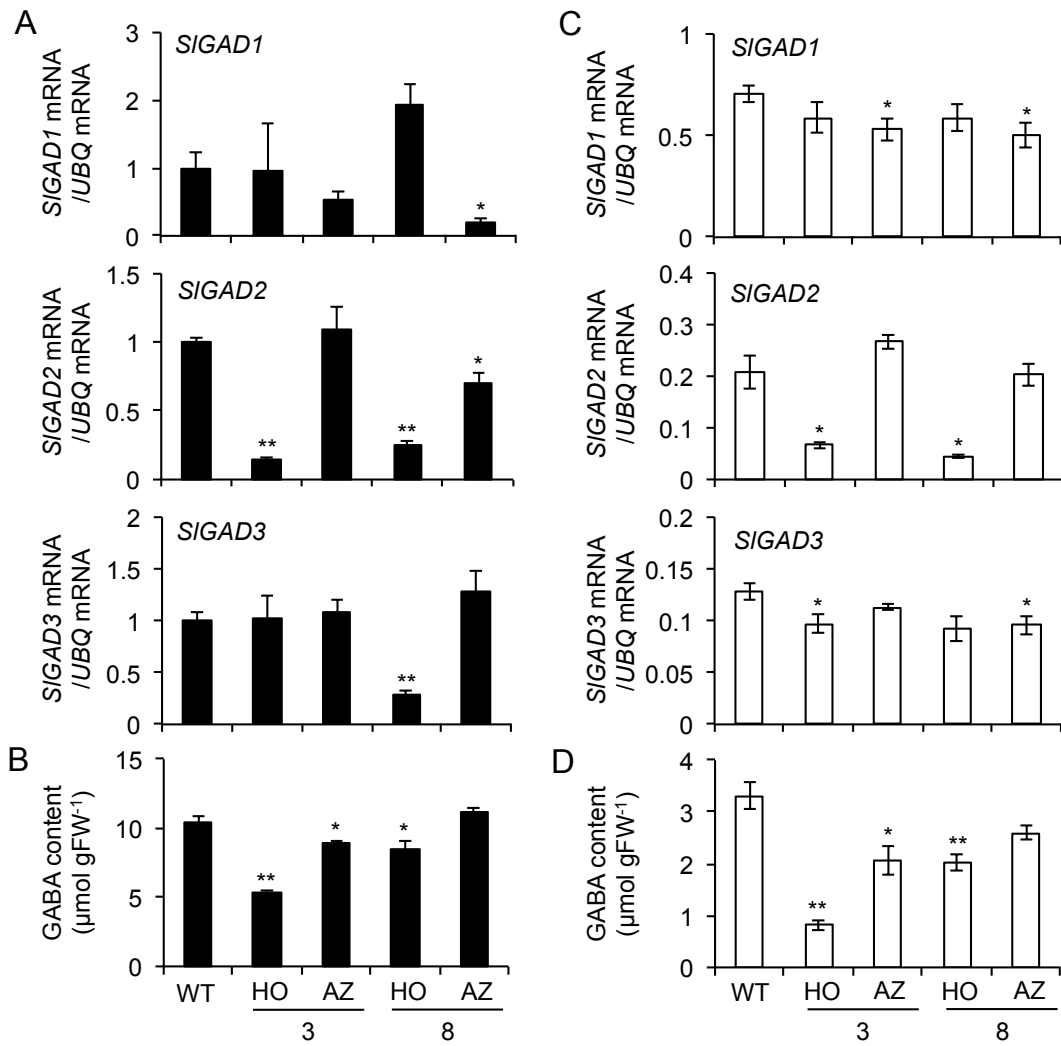
LB, left border; RB, right border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase II (カナマイシン耐性遺伝子); *HPT*, hygromycin phosphotransferase (ハイグロマイシン耐性遺伝子); P35S, CaMV35S promoter; T, terminator; PNOS, nos promoter; NOST, nos terminator; probe, サザンブロット解析に使用したプローブの領域.



**Fig. 4** *SIGAD* 発現抑制体 (RNAi) のサザンブロット解析 ( $T_0$  世代)  
*RNAi-SIGAD1* (A), *RNAi-SIGAD2* (B), *RNAi-SIGAD3* (C), *RNAi-SIGADall* (D) の解析結果.  
 葉から抽出したゲノム DNA (10  $\mu$ g) を *EcoRI* で消化し、*NPTII* プローブを用いて検出した.  
 ネガティブコントロールとして野性型 (WT) の解析も同時に行った.



**Fig. 5** T<sub>0</sub>世代における *SIGAD* 発現抑制体 (RNAi) の果実内 GABA 含量  
*RNAi-SIGAD1* (A), *RNAi-SIGAD2* (B), *RNAi-SIGAD3* (C), *RNAi-SIGADall* (D) の緑熟 (MG) 果実  
 および赤熟 (Red) 果実における GABA 含量を定量した。  
 コントロールとして野性型 (WT) の解析も同時に行った。  
 丸で囲った系統に関しては後代でも解析を行った。

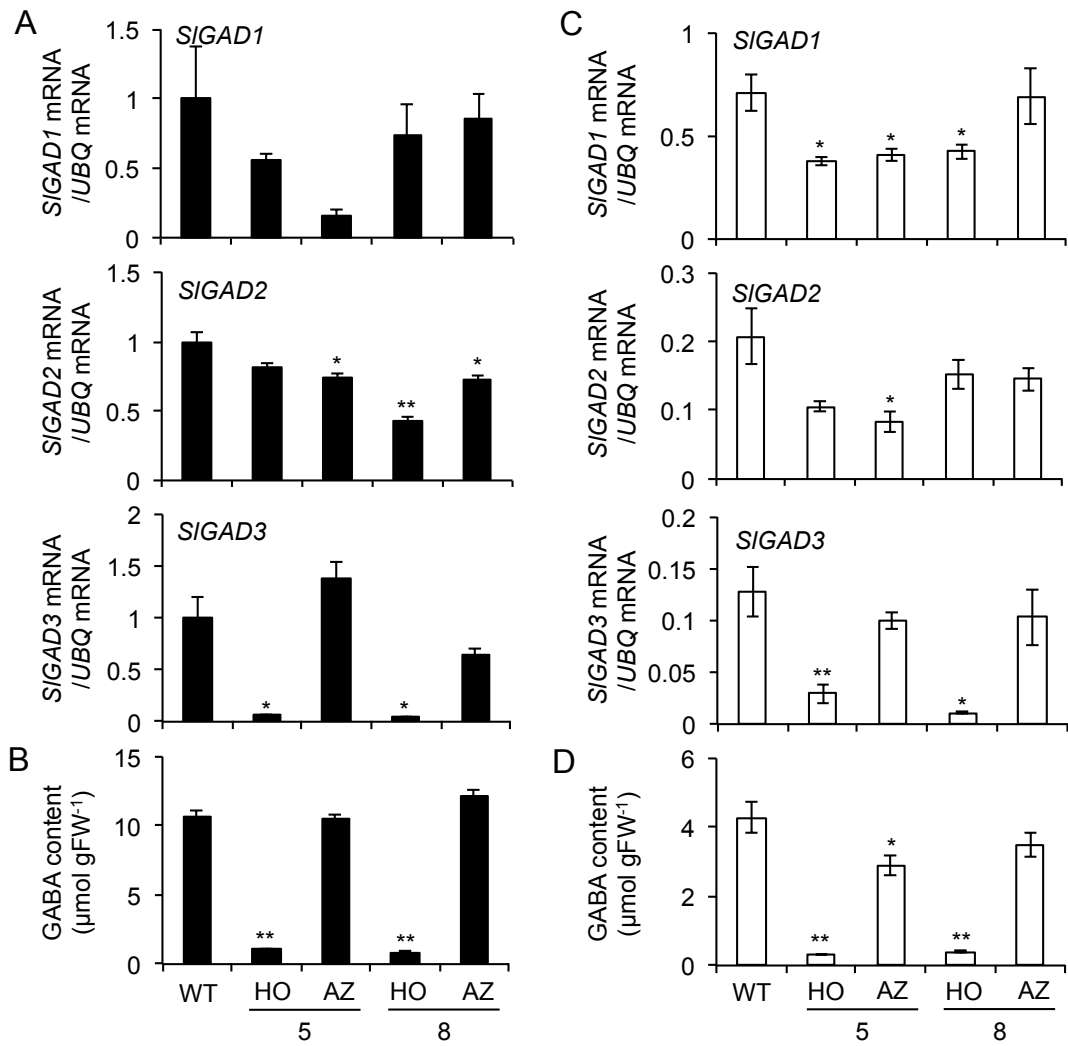


**Fig. 6** T<sub>2</sub>世代の *RNAi-SIGAD2* 果実における *SIGAD* 遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量  
独立した 2 系統のホモ系統 (3-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (3-AZ, 8-AZ) および WT を解析した。

- A. MG 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- B. MG 果実における GABA 含量
- C. Red 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- D. Red 果実における GABA 含量

qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。グラフの値は平均値±SE (n=4) を示す。

アスタリスクは野生型 (WT) とホモ系統 (HO) あるいは WT とアザイガス系統 (AZ) 間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01)。FW, fresh weight.

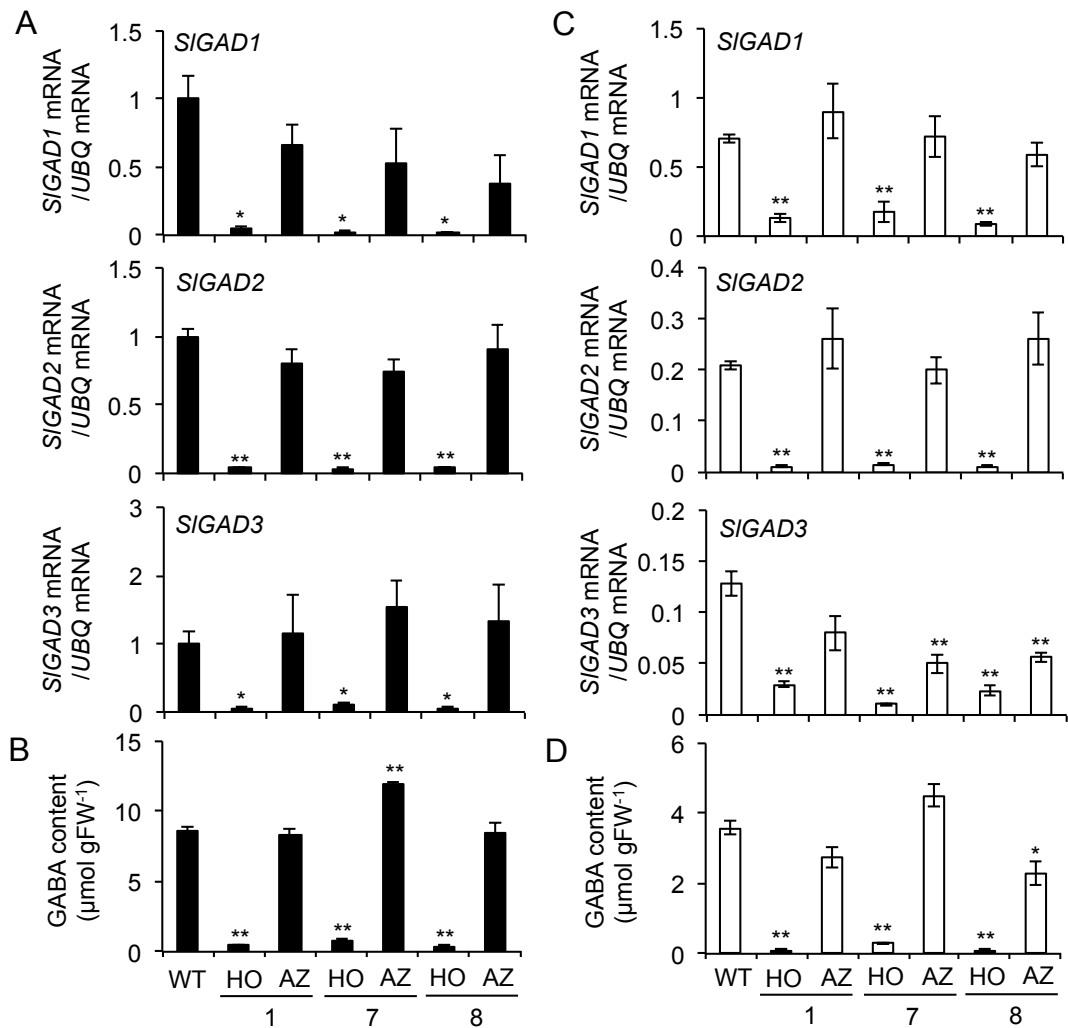


**Fig. 7** T<sub>2</sub>世代の *RNAi-SIGAD3* 果実における *SIGAD* 遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量  
 独立した 2 系統のホモ系統 (5-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (5-AZ, 8-AZ) および WT を解析した。

- A. MG 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- B. MG 果実における GABA 含量
- C. Red 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- D. Red 果実における GABA 含量

qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。グラフの値は平均値±SE (n=4) を示す。

アスタリスクは野生型 (WT) とホモ系統 (HO) あるいは WT とアザイガス系統 (AZ) 間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01)。FW, fresh weight.



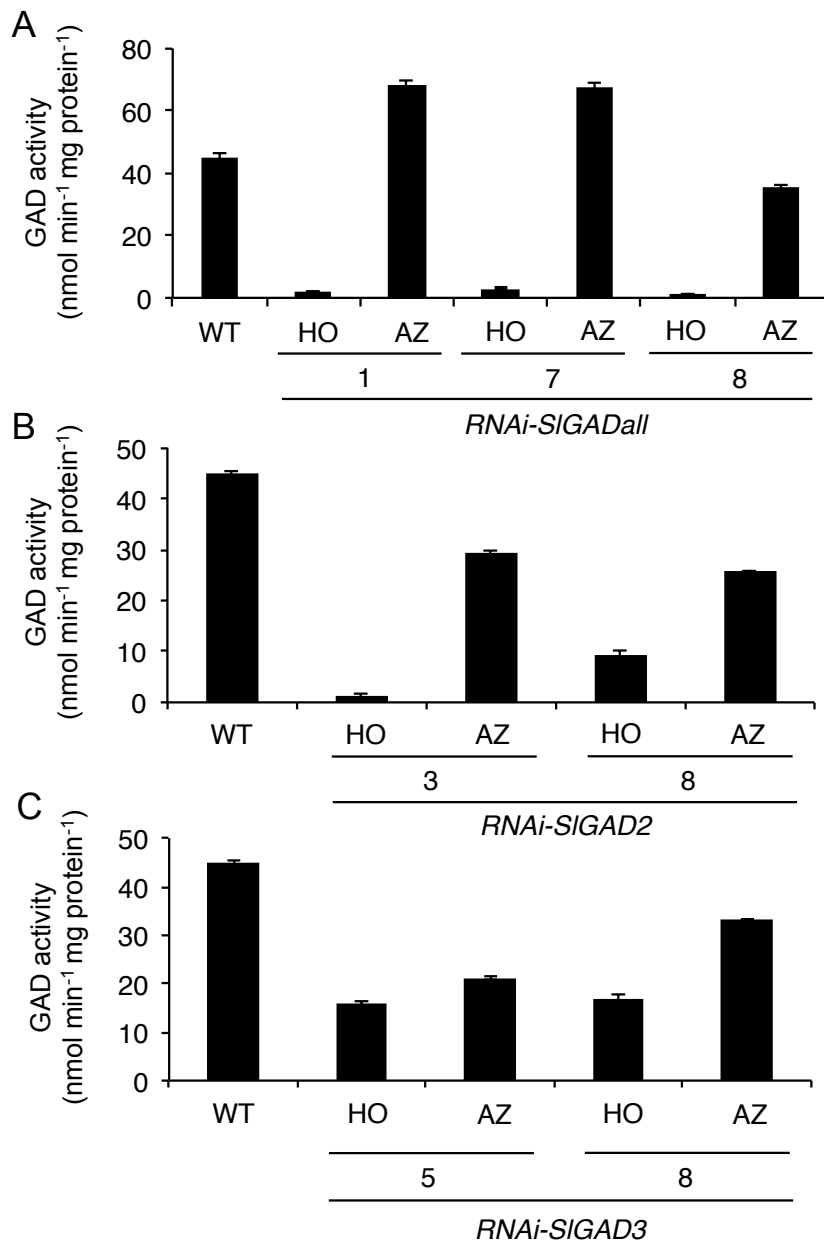
**Fig. 8**  $T_3$ 世代の *RNAi-SIGADall* 果実における *SIGAD* 遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量  
 独立した 3 系統のホモ系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) および WT を解析した。

- A. MG 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- B. MG 果実における GABA 含量
- C. Red 果実における *SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)
- D. Red 果実における GABA 含量

qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。グラフの値は平均値 $\pm$ SE (n=4) を示す。

アスタリスクは野生型 (WT) とホモ系統 (HO) あるいは WT とアザイガス系統 (AZ) 間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01)。FW, fresh weight.





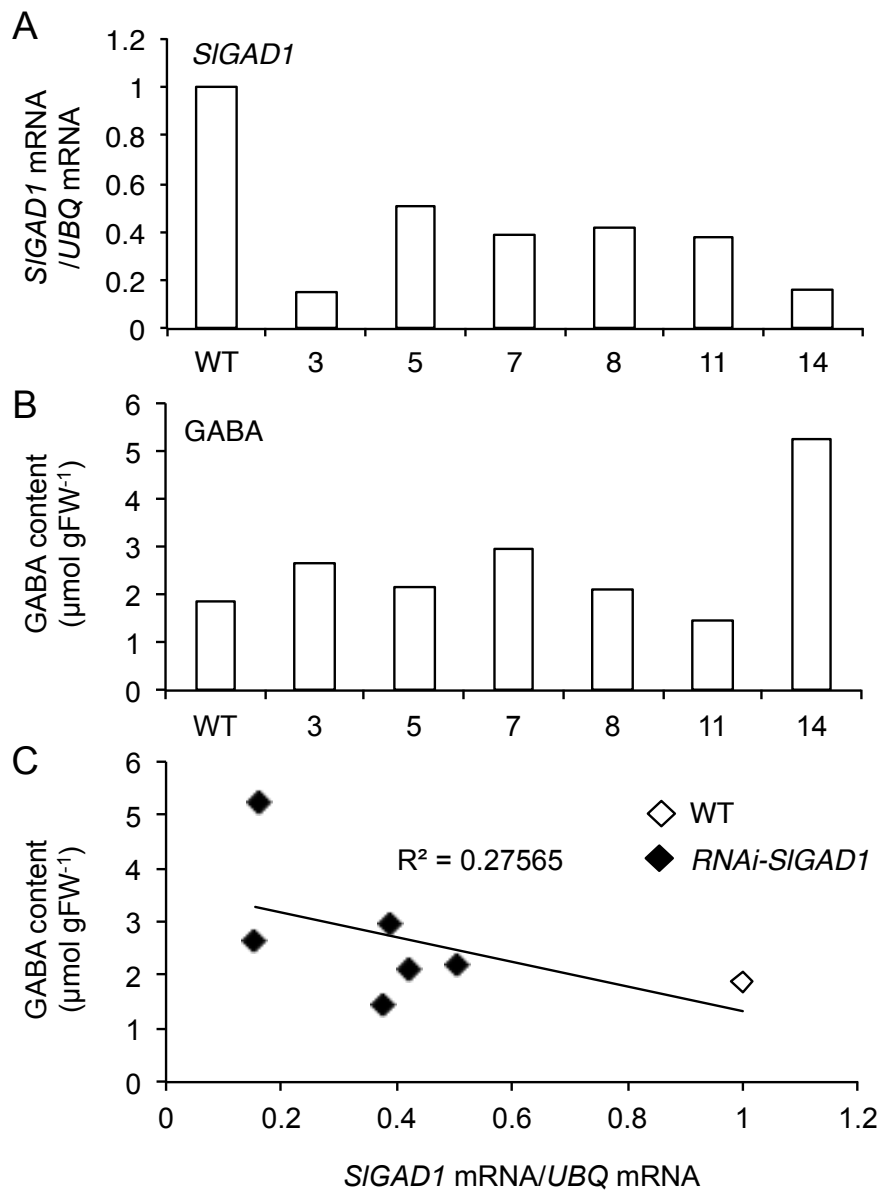
**Fig. 9** RNAi形質転換体のMG果実におけるGAD活性

A. T<sub>3</sub>世代の*RNAi-SIGADall*.

B. T<sub>2</sub>世代の*RNAi-SIGAD2*.

C. T<sub>2</sub>世代の*RNAi-SIGAD3*

グラフの値は3回の実験反復の平均を示す。各コンストラクトについて独立した実験を3回以上行なった。



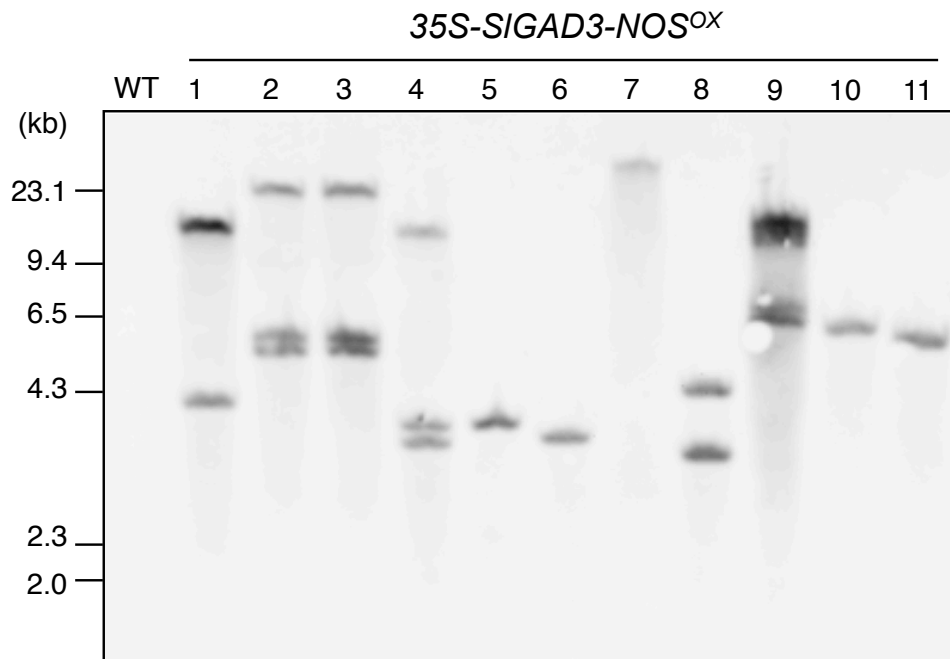
**Fig. 10** T<sub>0</sub>世代の *RNAi-SIGAD1* 果実における *SIGAD1* 遺伝子発現と GABA 含量の関係

A. Red 果実における *SIGAD1* の相対発現量 (qRT-PCR)

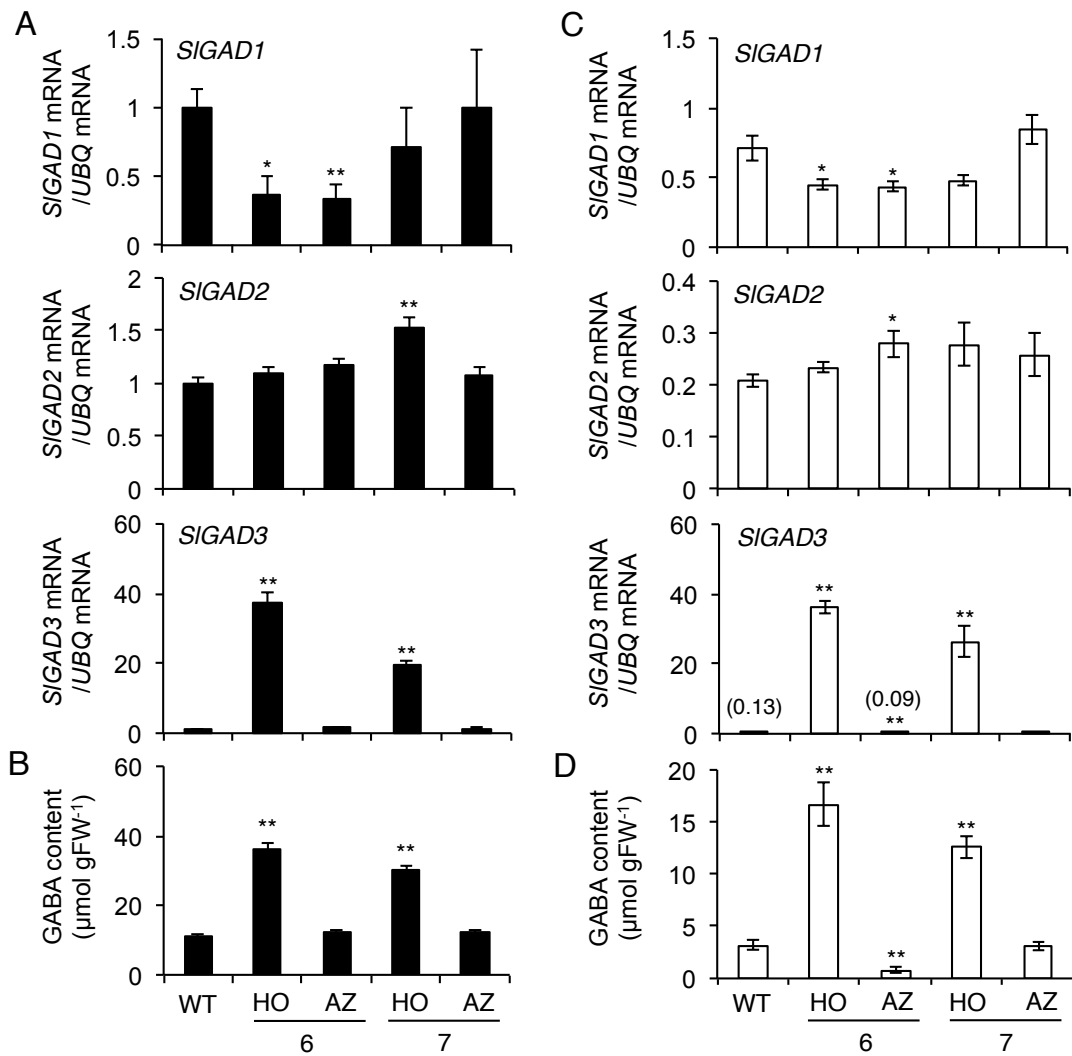
B. Red 果実における GABA 含量

C. *SIGAD1* 遺伝子の発現量と GABA 含量との相関関係

qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。



**Fig. 11** *SIGAD3* 過剰発現体 (*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*) のサザンブロット解析 ( $T_0$  世代)  
 葉から抽出したゲノム DNA (10  $\mu$ g) を *EcoRI* で消化し、*NPTII* プローブを用いて検出した。  
 ネガティブコントロールとして野生型 (WT) の解析も同時に行なった。

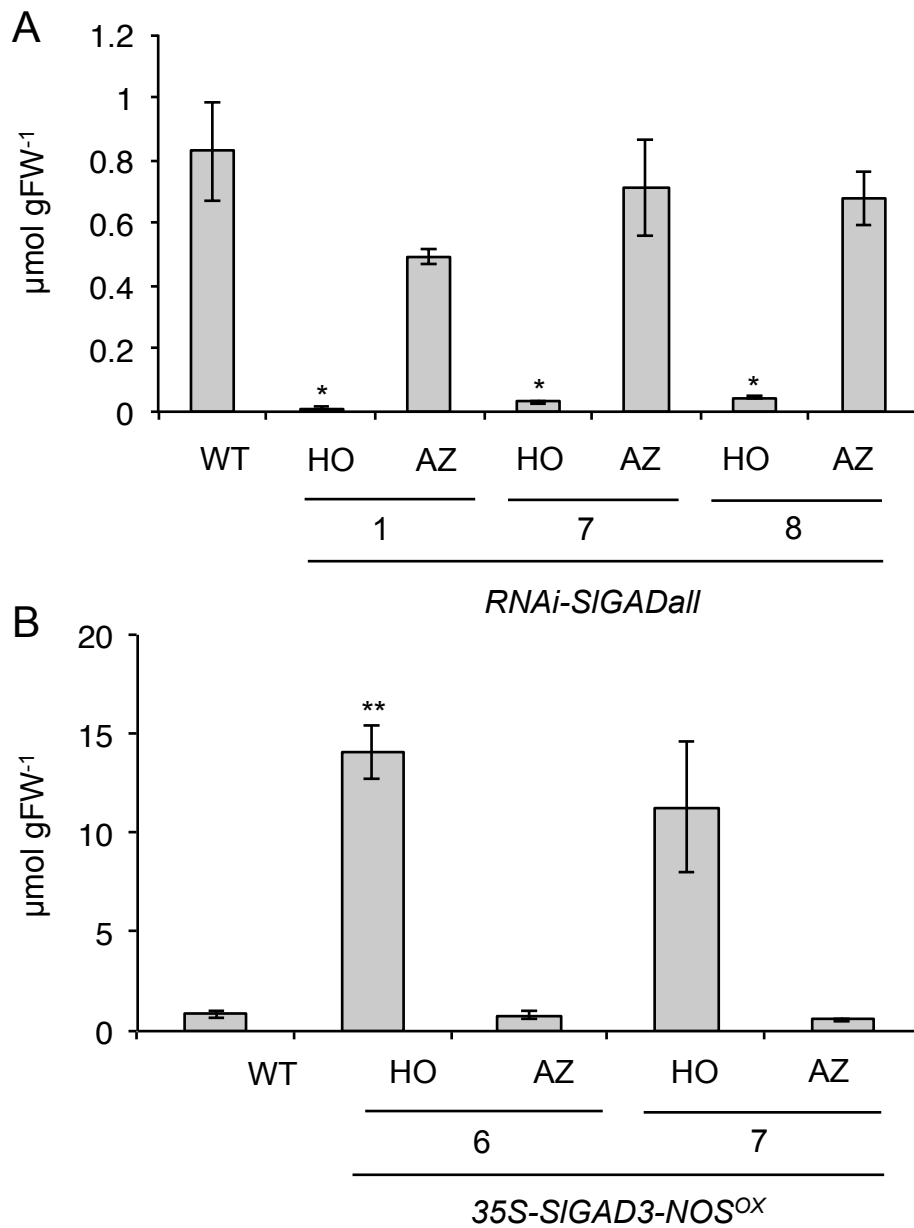


**Fig. 12**  $T_2$ 世代の  $35S\text{-SIGAD3-NOS}^{ox}$  果実における  $SIGAD$  遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量

独立した 2 系統のホモ系統 (6-HO, 7-HO), 対応するアザイガス個体 (6-AZ, 7-AZ) および WT を解析した.

- A. MG 果実における  $SIGAD1$ ,  $SIGAD2$ ,  $SIGAD3$  の相対発現量 (qRT-PCR)
- B. MG 果実における GABA 含量
- C. Red 果実における  $SIGAD1$ ,  $SIGAD2$ ,  $SIGAD3$  の相対発現量 (qRT-PCR)
- D. Red 果実における GABA 含量

qRT-PCR は  $SIUbiquitin3$  を内部標準に用いた. グラフの値は平均値 $\pm$ SE (n=4) を示す. アスタリスクは野生型 (WT) とホモ系統 (HO) あるいは WT とアザイガス系統 (AZ) 間で Student's  $t$  検定による有意差があることを示す (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01). FW, fresh weight.



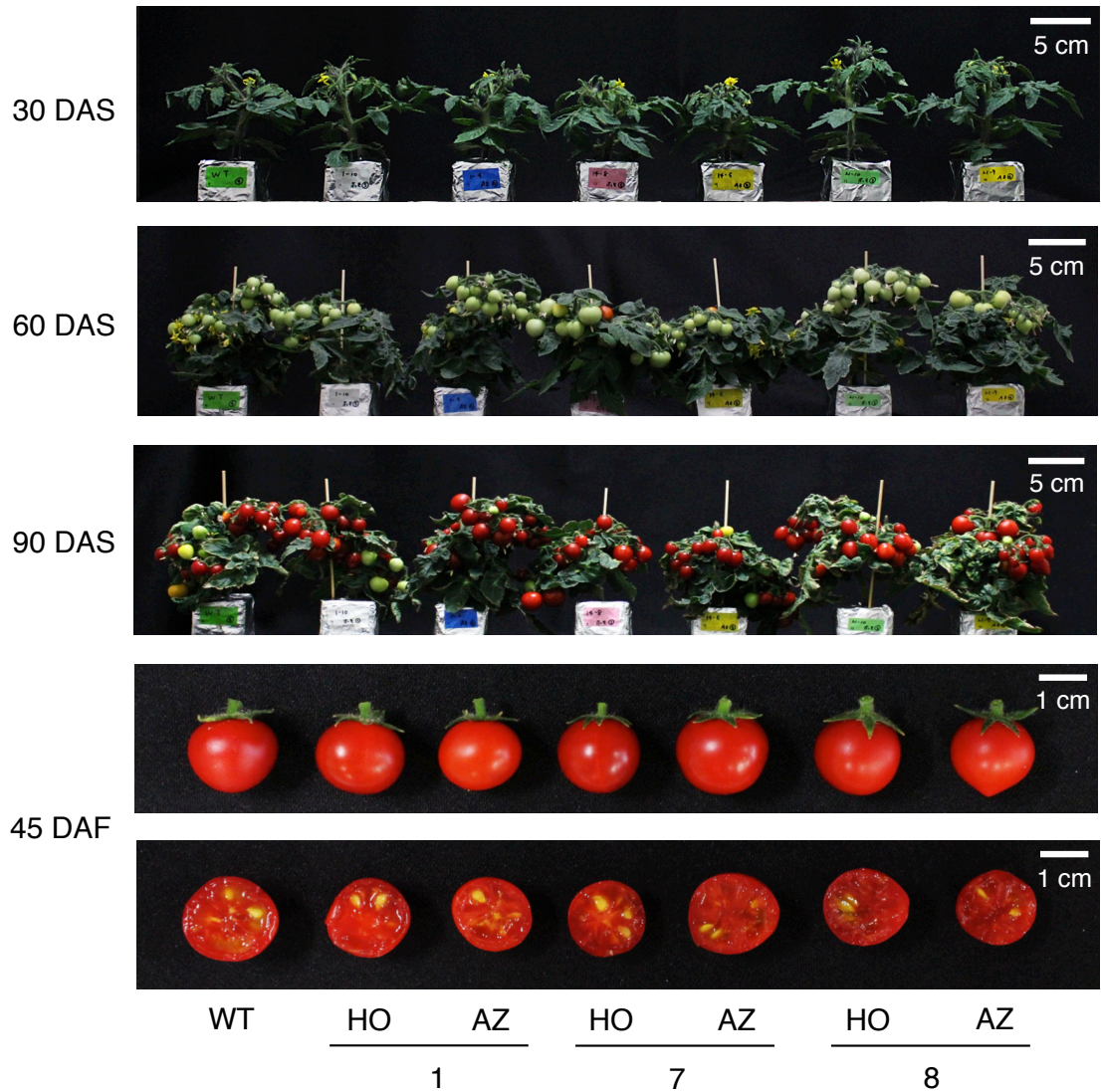
**Fig. 13** *RNAi-SIGADall* および *35S-SIGAD3-NOS<sup>ox</sup>* の葉における GABA 含量の定量  
22 日齢のトマト植物体の葉における GABA 含量を測定した。

A. T<sub>5</sub> 世代の *RNAi-SIGADall*.

B. T<sub>3</sub> 世代の *35S-SIGAD3-NOS<sup>ox</sup>*.

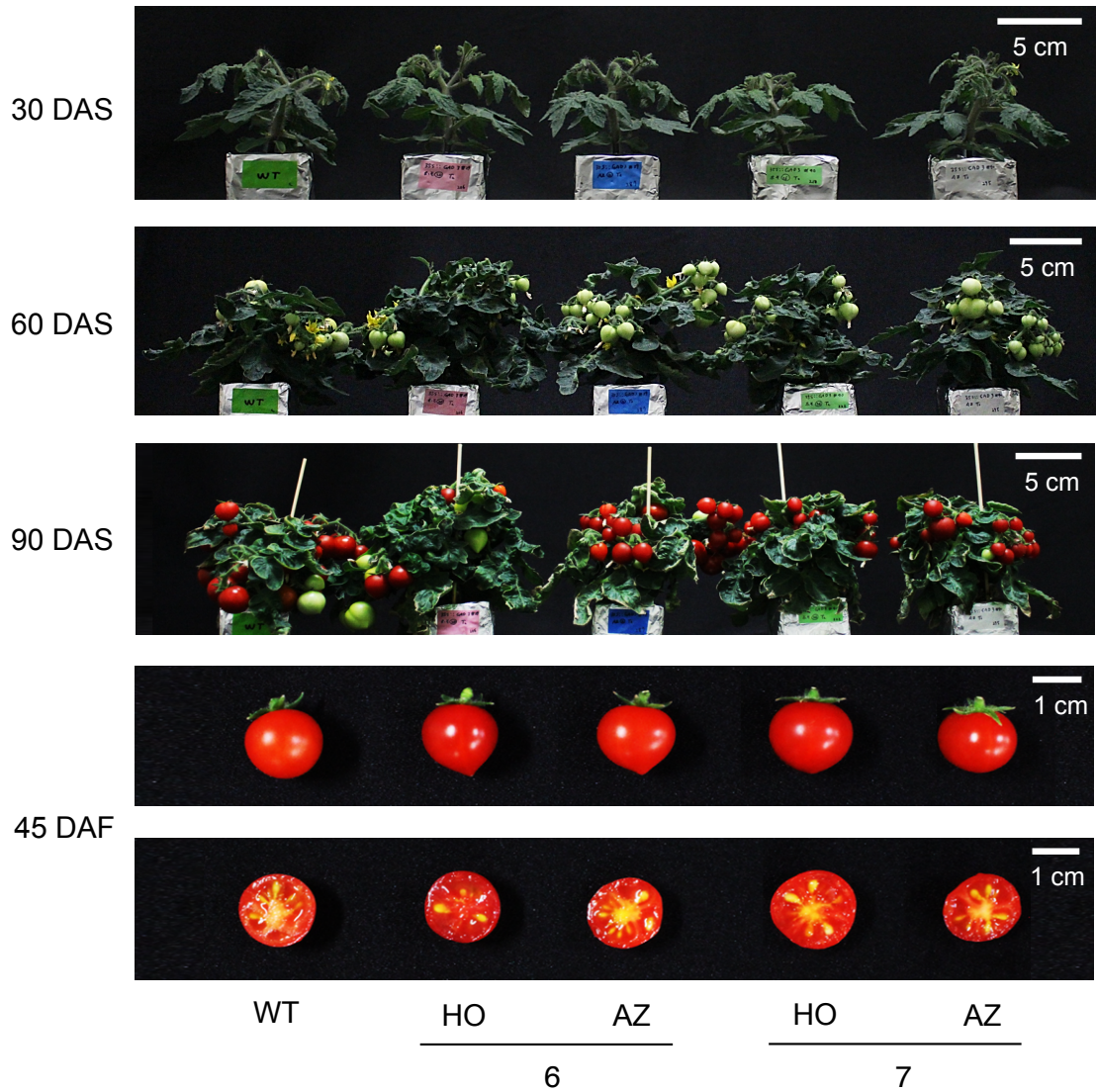
グラフの値は平均値±SE (n=3) を示す。

アスタリスクは野生型 (WT) とホモ系統 (HO) あるいは WT とアザイガス系統 (AZ) 間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01). FW, fresh weight.



**Fig. 14** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall* における植物体と果実の表現型

独立した3系統のホモ系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) およびWTを同時に栽培した. 写真は上から播種後 (Days after sowing; DAS) 30日, 60日, 90日目の植物体, 開花後 (Days after flowering; DAF) 45日目の果実の様子.



**Fig. 15** T<sub>2</sub>世代の *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*における植物体と果実の表現型

独立した2系統のホモ系統 (6-HO, 7-HO), 対応するアザイガス個体 (6-AZ, 7-AZ) およびWTを同時に栽培した. 写真は上から播種後 (Days after sowing; DAS) 30日, 60日, 90日目の植物体, 開花後 (Days after flowering; DAF) 45日目の果実の様子.

## 第 2 章

### GABA 低蓄積組換えトマトと非組換えトマトのメタボローム解析



## 2-1 緒言

植物において GABA は様々な環境刺激(塩, 熱, 低温, 機械的刺激, 低酸素, 機械的刺激, 植物ホルモン) に応答して急激に蓄積されることが知られている (Bown and Shelp 1997; Shelp et al. 1999) . また, GABA の機能として花粉管伸長の制御 (Palanivelu et al. 2003; Yu et al. 2014) , 食害および病原菌侵略からの防御 (Bown et al. 2006; Seifi et al. 2013) , 細胞伸長の抑制 (Renault et al. 2011) など多様な生理反応への関与が示唆されている. しかしながら, 動物と比較すると植物における GABA の機能は未だ不明確であり, また, 果実に関しては情報が乏しいのが現状である.

本論文の第 1 章では, 果実内 GABA 含量が WT とは有意に異なる組換えトマト系統を複数作出した. しかしながら, いずれの系統においても見た目の表現型に際立った異常はみられず, トマトにおける GABA の機能を明らかにする手がかりは得られなかった. 一般に, トマトは開花直後から緑熟期にかけて GABA を高蓄積するが, その時期の果実において GABA は最も存在比の多い遊離アミノ酸であることが知られている (Boggio et al. 2000; Sorrequieta et al. 2010) . 果実内 GABA 含量が最大となる緑熟期の果実に至っては, 遊離アミノ酸の 50%をも GABA が占めると言われている (Rolin et al. 2000) . しかしながら, GABA が何故, 果実発達初期に優先的に蓄積され, 一方, 赤熟期には急激に分解されてしまうのか, その生理学的意義は未だ不明である. そこで本章では, トマト果実における GABA 代謝の動態を明らかにすることを目的とし, 第 1 章で作出した GABA 低蓄積組換えトマト (果実内 GABA 含量が WT の 10%以下に減少した *RNAi-SIGADall* 系統) と非組換えトマトを用いて, 果実内の一次代謝物量を一斉解析した.

## 2-2 材料および方法

### 2-2-1 供試植物

供試植物はトマト ‘Micro-Tom’ の WT, 第 1 章で作出した *RNAi-SIGADall* の HO 系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO) および AZ 系統 (1-AZ, 7-HO, 8-HO) を用いた. HO 系統および AZ 系統はいずれも T<sub>3</sub> 世代の植物体を用いた.

### 2-2-2 栽培条件

トマトの育苗は (1-2-12) と同様, 植物工場の苗テラスにて行い, 第 1 花房の開花期

に同植物工場内の別の栽培装置に移動させた。この栽培装置には 90 cm×16 cm×9 cm の桶が複数設置してあり、その中に植物体を定植できる構造となっている。灌水は下に設置された液肥タンク内から吸水ポンプ、ホース、チューブをつたって桶に流れ込む仕組みとなっており、タイマー制御により 45 分の給水と 15 分の停止を繰り返し行った。液肥には大塚ハウス A 処方 [大塚 1 号 1.5 g/l, 大塚 2 号 1 g/l] (大塚化学) を用い、電気伝導度 (EC) は 2.0 dS/m に設定した。明期 25°C /暗期 20°C, 16 時間明期 ( $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $\text{CO}_2$  濃度 600 ppm 条件にて栽培を行った。

### 2-2-3 果実のサンプリングと一次代謝物の測定

WT, *RNAi-SIGADall* HO 系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO) および AZ 系統 (1-AZ, 7-HO, 8-HO) の植物体から緑熟果実と赤熟果実を 6 果実ずつ収穫した。収穫した果実は種子とゼリー部分を除去した後、一定量のペリカーブを液体窒素で凍結した。凍結したサンプルは理化学研究所にて凍結乾燥と誘導体処理が行われ、その後、ガスクロマトグラフ-飛行時間型-質量分析計 (gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, GC-TOF-MS) による一次代謝物の一斉解析が実施された。データの処理と補正は Kusano et al. (2011) に従って行われた。

## 2-3 結果

トマト果実における GABA 代謝の生理学的意義を探求するため、GABA 低蓄積組換え体 (*RNAi-SIGADall* HO 系統) と非組換え体 (WT および *RNAi-SIGADall* AZ 系統) の緑熟果実、赤熟果実における一次代謝物量を一斉解析した。果実内の一次代謝物の解析には GC-TOF-MS を用いた。同定された 116 種類の代謝物の中から、組換え体 (HO 系統) と非組換え体 (WT または AZ 系統) 間で含量に有意差がみられた代謝物のみをピックアップした。まず、緑熟果実に関して HO 系統と WT 間で比較 (HO/WT) を行うと、系統 1-HO, 7-HO, 8-HO においてそれぞれ 1 個, 8 個, 5 個の代謝物が WT よりも有意な減少を示し、2 個の代謝物 (未同定の代謝物 MST11, GABA) に関しては 3 つの HO 系統に共通して有意な減少がみられた (Fig. 16A 上)。反対に、WT と比較して HO 系統で有意に増加した代謝物に関しては、系統 1-HO, 7-HO, 8-HO に特異的なものがそれぞれ 2 個, 12 個, 8 個, 系統 1-HO, 8-HO に共通するものが 2 個, 系統 7-HO, 8-HO に共通するものが 8 個, そして 3 つの HO 系統に共通するものが 3 個 (グルタミン酸, フェニルアラニン,

MST4) であった (Fig. 16A 下) . 続いて, HO 系統とそれぞれの HO 系統に対応する AZ 系統間で比較 (HO/AZ) を行ったところ, 系統 1-HO, 7-HO, 8-HO に特異的な変動を示す代謝物は複数検出されたものの, 2 系統以上の HO 系統で共通して変動する代謝物の数は HO/WT と比較すると少なくなった (Fig. 16B) . その数は, 3 つの HO 系統に共通して減少したものが 1 個 (GABA) , 増加したものに関しては系統 1-HO, 8-HO に共通するものが 1 個 (アラニン) , 系統 7-HO, 8-HO に共通するものが 1 個 (グルタミン酸) のみで, 3 つの HO 系統に共通するものはなかった (Fig. 16B) . Fig. 16 において 3 つの HO 系統のうち, 2 系統以上で共通した変動がみられた代謝物に関しては, Fig. 17 に  $\log_2$ -fold change を示した. HO 系統と WT 間で比較 (HO/WT) を行うと, 15 個の代謝物が 2 系統以上の HO 系統に共通して変動する代謝物として抽出され, 最も大きく変動しているの代謝物は GABA であった (Fig. 17A) . GABA は GC-TOF-MS による測定においても 3 つの HO 系統で共通して減少しており, 第 1 章で行った GABase 酵素アッセイによる定量と一致する結果となった (Figs. 8B; 17A) . 増加した代謝物の中では, GABA の前駆体であるグルタミン酸やフェニルアラニン, 未同定の MST4 といった代謝物が 3 つの HO 系統に共通して増加していた (Fig. 17A) . 一方, HO 系統と AZ 系統間で比較 (HO/AZ) を行うと, 3 個の代謝物のみが抽出され, HO/WT と同様に GABA が 3 つの HO 系統に共通して減少していた (Fig. 17B) . グルタミン酸とアラニンは 3 つの HO 系統のうち, 2 系統に共通して有意に増加していた. また, HO/WT と HO/AZ の解析結果を比較すると, 両比較において共通した増減傾向を示したのは GABA とグルタミン酸のみであった (Fig. 17A, B) . 同様の解析を赤熟果実に関しても行った. まず HO 系統と WT 間で比較 (HO/WT) を行い, 有意差のある代謝物のみをピックアップすると, 2 個の代謝物が 1-HO, 7-HO に共通して, また別の 2 個の代謝物が 3 つの HO 系統に共通して減少していた (Fig. 18A 上) . 一方, WT と比較して HO 系統で有意に増加した代謝物に関しては, 系統 1-HO, 7-HO に共通するものが 17 個, 系統 1-HO, 8-HO に共通するものが 1 個, そして 3 つの HO 系統に共通するものが 11 個抽出された (Fig. 18A 下) . 次に, HO 系統と AZ 系統間で比較 (HO/AZ) を行ってみると, 緑熟果実での結果と同様, 2 系統以上の HO 系統で共通して変動する代謝物の数は HO/WT と比較すると非常に少なくなった (Fig. 18B) . AZ と比較して有意に減少した代謝物の数は, 系統 7-HO, 8-HO に共通するものが 2 個, 3 つの HO 系統に共通するものが 1 個であった. 反対に増加した代謝物の数は, 系統 1-HO, 7-HO に共通するものが 2 個, 系統 7-HO, 8-HO に共通するものが

1個のみで、3つのHO系統に共通するものはなかった (Fig. 18B) . これらの2系統以上で共通した変動がみられた代謝物に関しては、Fig. 19 に  $\log_2$ -fold change を示した. HO/WT, HO/AZ いずれの比較解析においても GABA は3つのHO系統に共通して減少がみられた (Fig. 19) . HO/WT では多くの代謝物が有意差のある代謝物として抽出されたが、HO/WT と HO/AZ の両比較において共通した増減傾向を示した代謝物は GABA のみであった (Fig. 19) .

#### 2-4 考察

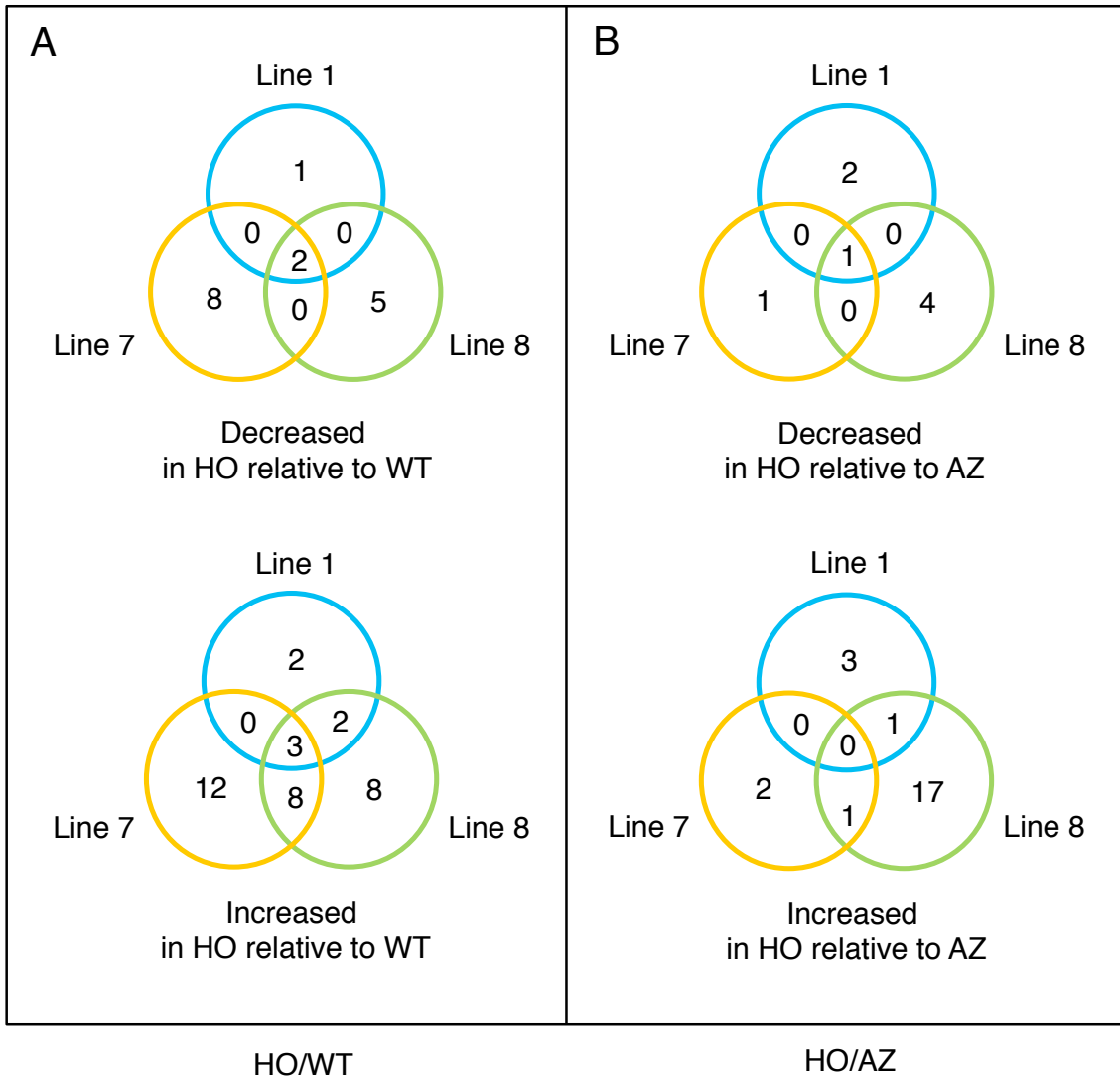
本章では、トマト果実発達過程で GABA 含量がダイナミックに変動する生理学的な意義を探求することを目的とし、果実内 GABA 含量が減少した *RNAi-SIGADall* 系統と非組換え体の果実を用いてメタボローム解析を行った. 本実験では *RNAi-SIGADall* HO 系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO) の果実内一次代謝物の含量を WT あるいは対応する AZ 系統 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) の含量と比較した. WT と AZ 系統はいずれも正常な果実内 GABA 含量を有するため (Fig. 8B, D) , 仮に HO 系統において GABA 含量の減少が他の代謝物の含量に影響を及ぼすのであれば、その影響を受けた代謝物の含量は HO/WT と HO/AZ の両比較において共通した増減傾向を示すと考えられる. しかしながら、本実験の結果では、HO/WT と HO/AZ の両比較において3つのHO系統間で共通した変動を示した代謝物の数が大きく異なった (Fig. 17, 19) . 例えば緑熟果実では、HO/WT 比較において15個の代謝物が2系統以上のHO系統に共通して有意差が見られたのに対し、HO/AZ 比較においては3個のみであった (Fig. 17) . さらに、HO/WT と HO/AZ の両比較において共通した増減傾向を示した代謝物は GABA とグルタミン酸のみであった (アラニン は HO/AZ 比較において3つのHO系統間で共通した増減傾向を示さなかった; Fig. 17B) . これらの結果は、緑熟果実のHO系統において GABA 含量の減少がもたらした影響は、今回調査した代謝物の中ではグルタミン酸含量の増加のみであったことを示唆している. また、赤熟果実に関しても HO/WT 比較において33個の代謝物が2系統以上のHO系統に共通して有意差がみられたのに対し、HO/AZ 比較においては5個のみであった (Fig. 19) . 驚くことに、HO/WT と HO/AZ の両比較において共通した増減傾向を示した代謝物は GABA 以外にみられなかった (Fig. 19) . 一般に、導入遺伝子の影響は HO 系統と AZ 系統を比較することで、培養変異の影響は WT と AZ 系統を比較することで個別に評価できると言われている (Zhou et al. 2012) . 本実験では、2系統以上の

HO 系統に共通して有意差が見られた代謝物の数が HO/WT 比較よりも HO/AZ 比較において極端に減少した (Fig. 17, 19) . このことは, HO/WT 比較で見られた有意差の大部分が培養変異によるものであることを示唆している. 同様の傾向は Zhou et al. (2012) の形質転換イネを用いた研究においても観察されている. 彼らは *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin (*Bt*) 遺伝子および *cowpea trypsin inhibitor* (*CpTI*) 遺伝子をコトランスフォーマーメーションした形質転換イネを用いてメタボローム解析を行い, AZ 系統あるいは WT との比較解析を行った. その結果, 形質転換体と AZ 系統間の代謝物変動は WT と AZ 系統間の代謝物変動と比較して小さく, 観察された変動の大部分は培養変異によるものではないかと考察している. また, Kusano et al. (2011) は味覚修飾タンパク質であるミラクリンを過剰発現させた組換えトマトを用いてメタボローム解析を行い, 92%以上の代謝物が非組換え体と類似性を示すことを報告した. AZ との比較は行われていないが, わずかに検出された相違性に関しては培養変異による影響ではないかと考察している.

植物において, GAD の活性化は代謝に大きな影響を与えることが報告されている. 例えば, C 末の伸長領域を切除したイネの *GAD* (*OsGAD2*) を過剰発現させた組換えカルスでは, GABA の含量が増加し, グルタミン酸, アスパラギン酸, スレオニン, アスパラギン, グルタミンの含量が減少することが知られている (Akama and Takaiwa 2007) . また, C 末の伸長領域を切除したペチュニアの *GAD* を過剰発現させたシロイヌナズナの種子では, 種子成熟の過程で C-N バランスが大きく変化することが報告されている (Fait et al. 2011) . 一方, 本研究で *GAD* の発現を抑制させた組換えトマトでは, 他の代謝産物の含量にほとんど影響を及ぼさなかった. 緑熟果実のみで唯一確認されたグルタミン酸の増加は, *SIGAD* の効果的な抑制に起因する考えられる. なぜならば, グルタミン酸は GABA の前駆体であり, GAD 酵素の基質として利用されるためである. しかしながら, グルタミン酸の増加率は GABA の減少率と比較すると小さかった (Fig. 17) . 同様の結果は, シロイヌナズナの *GAD1* 欠損変異体の根においても観察されており, この変異体では WT と比較して GABA が 1/7 に減少したにも関わらず, グルタミン酸の含量に有意な差はみられなかった (Bouché et al. 2004b) . グルタミン酸は植物の窒素代謝において重要な役割を果たすことが知られており, GABA だけでなくプロリン, アルギニン (ポリアミンの前駆体) ,  $\alpha$ -ケトグルタル酸の前駆体として, さらにはアスパラギン酸, アラ

ニン、グリシンなどを生産する様々なアミノ基転移反応においても利用される (Forde and Lea 2007) . そのため, *RNAi-SIGADall* 系統では SIGAD 酵素によるグルタミン酸の消費量は減少すると考えられるが, 利用されずに残ったグルタミン酸の一部は他のグルタミン酸代謝酵素によって速やかに利用され, 見かけ上の増加率が小さく見積もられている可能性が考えられる. 赤熟果実に関しては, グルタミン酸含量にも有意差はみられなかった. 先行研究において, ‘Micro-Tom’ の果実内 GAD 活性は緑色期に強く, 赤色期には検出されないことが明らかにされている (Akihiro et al. 2008) . このことから, 赤熟果実においては *SIGAD* の発現抑制がもたらす効果は低く, 結果としてグルタミン酸の含量にも有意差がみられなかったと示唆される.

本章では, GAD の発現を抑制した組換え体を利用することで, トマト果実における GABA 代謝の流れを明らかにしたいと考えた. しかしながら, 緑熟果実, 赤熟果実のいずれにおいても他の一次代謝物の含量に大きな影響はみられなかった. また, 第 1 章の結果から, 植物体の表現型にも大きな異常は観察されなかった. 他の植物種における研究では, GABA を高蓄積する条件 (C 末を切除した GAD の過剰発現, GABA-T または SSADH の機能喪失等) において, 著しい表現型の異常や代謝物の変動が観察されている. トマトにおける GABA の機能を明らかにするには, 他の植物種と同様, GABA を過剰に蓄積させたときの影響も調査する必要があるかもしれない. 第 1 章では *SIGAD3* の発現がトマト果実内の GABA 含量に大きな影響を及ぼす律速因子であることが明らかとなり, 実際に *SIGAD3* を過剰発現させることで WT の 2.7-5.2 倍に果実内 GABA 含量が増加することを確認した (Fig. 12B, D) . しかしながら, 作出した組換え体の表現型には大きな異常はみられなかった (Fig. 15) . そこで, 第 3 章では GABA をさらに高蓄積する組換えトマトの作出方法を検討することとした.

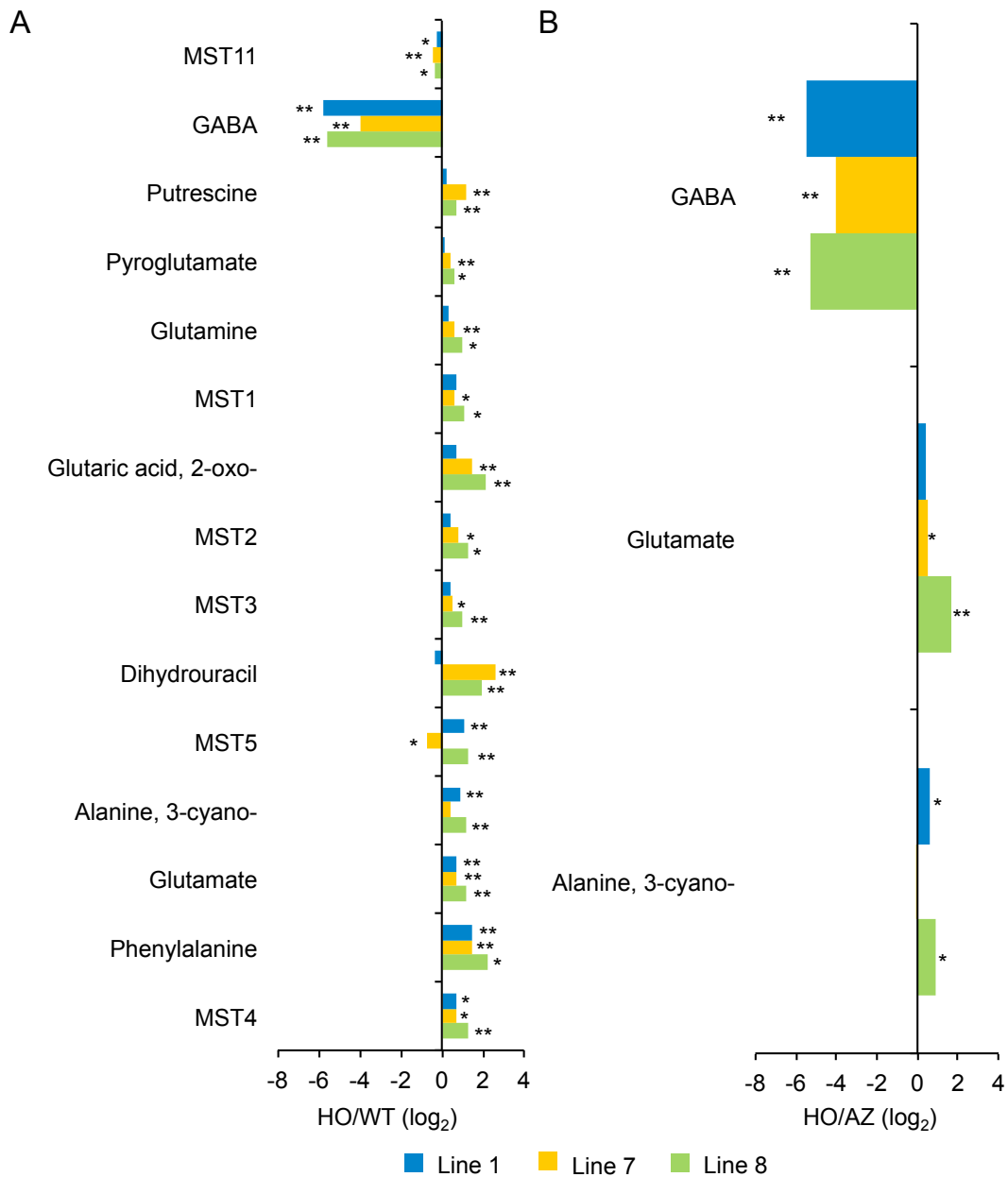


**Fig. 16** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall* MG 果実における一次代謝物の変動

独立した3系統のホモ系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) および WT の MG 果実における一次代謝物の含量を一斉解析した.

A. WT と比較したときにホモ系統 (HO) で有意に減少あるいは増加した代謝物の数

B. アザイガス (AZ) と比較したときに HO 系統で有意に減少あるいは増加した代謝物の数  
HO/AZ の比較をする際には各 HO 系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO) における代謝物の含量をそれぞれ対応する AZ 系統 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) の値で除算した.



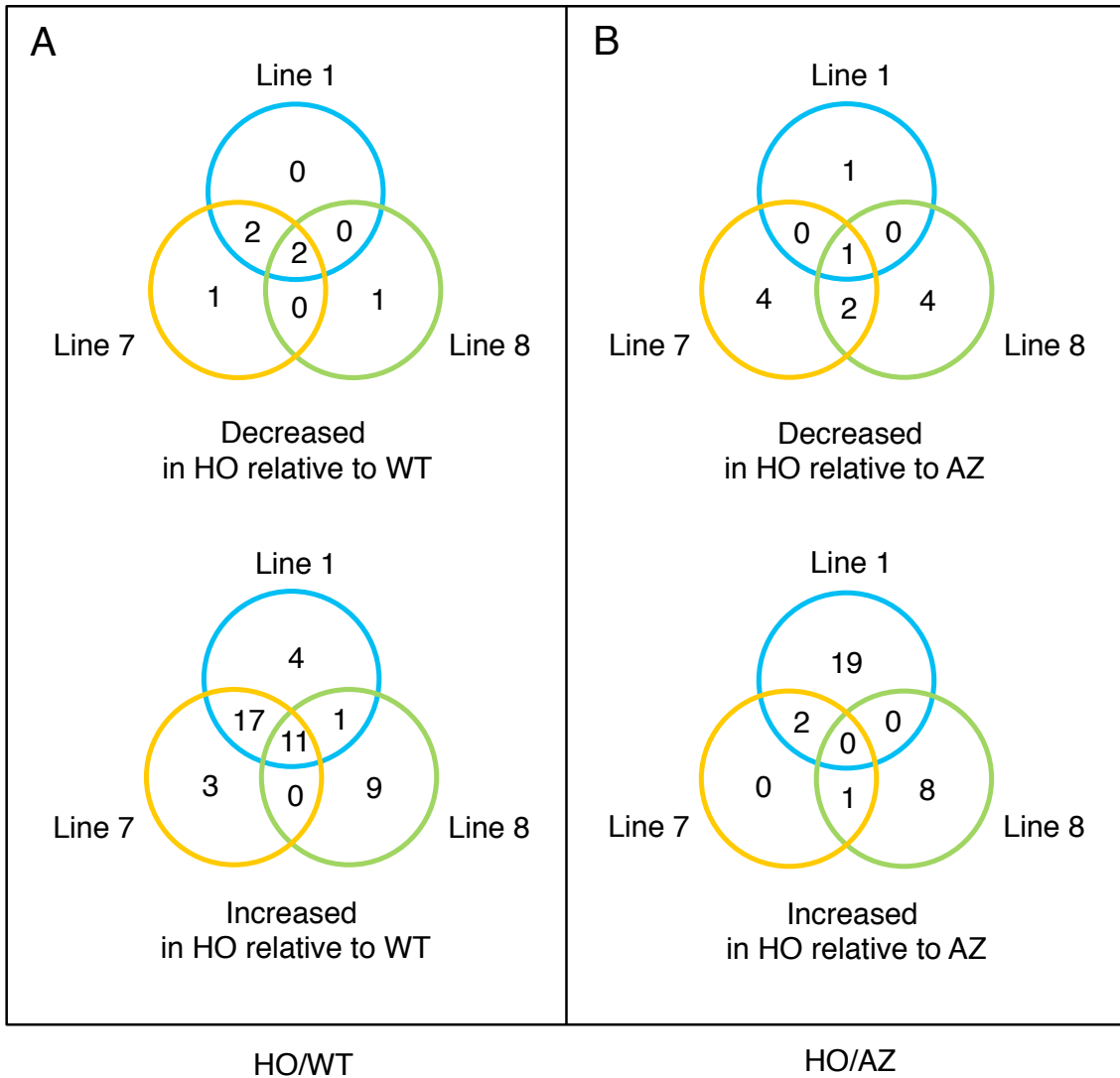
**Fig. 17** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall* MG 果実において 2 系統以上の HO 系統で共通した変動を示した一次代謝物

A. WT と比較したときに 2 系統以上のホモ系統 (HO) でみられた代謝物の変動

B. アザイガス (AZ) と比較したときに 2 系統以上の HO 系統でみられた代謝物の変動  
 グラフの値は平均値 (n=6) を示す.

アスタリスクは WT と HO 系統あるいは WT と AZ 間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01). MST, mass spectral tag (unidentified metabolite).



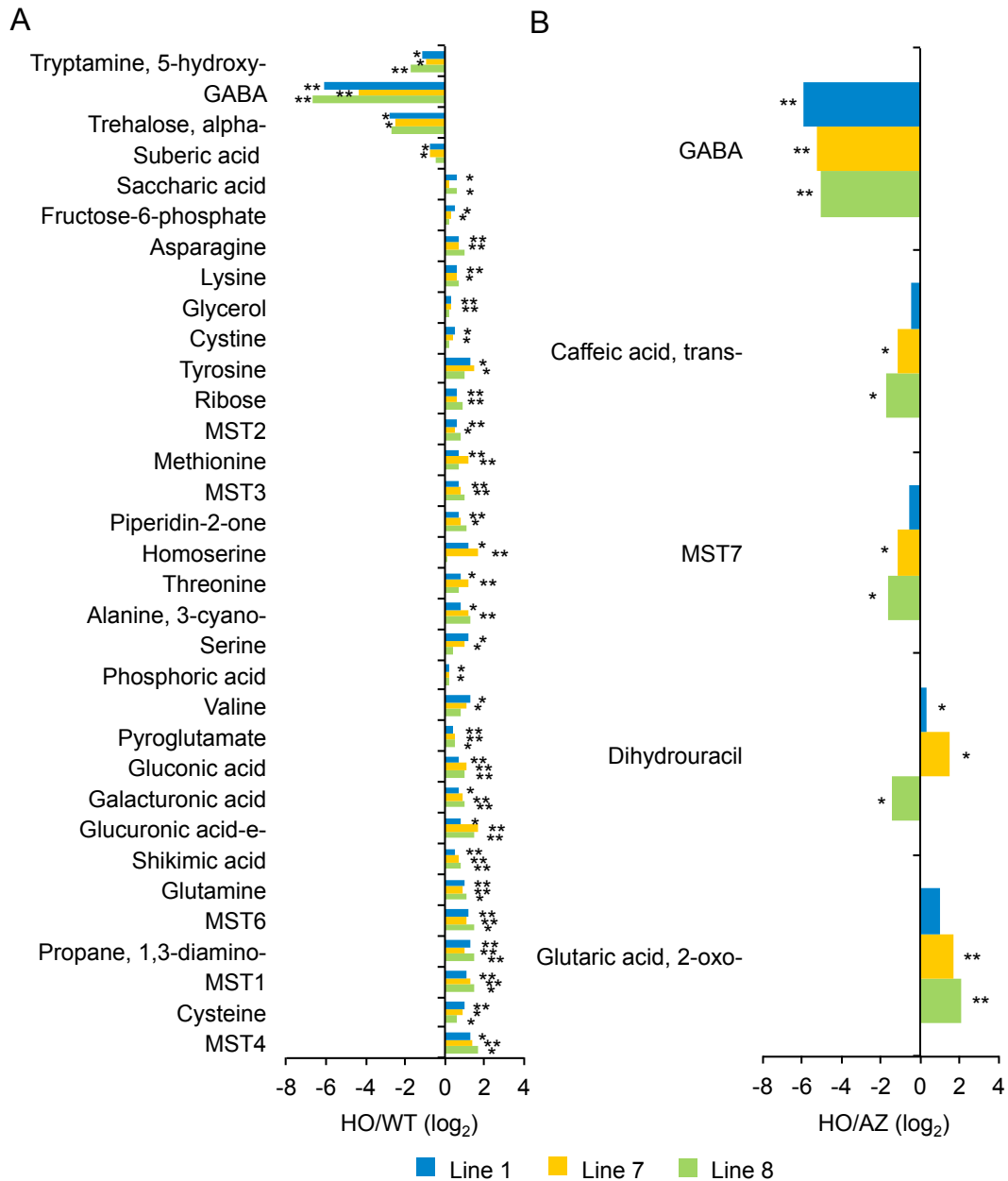


**Fig. 18** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall* Red 果実における一次代謝物の変動

独立した3系統のホモ系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO), 対応するアザイガス個体 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) および WT の Red 果実における一次代謝物の含量を一斉解析した.

A. WT と比較したときにホモ系統 (HO) で有意に減少あるいは増加した代謝物の数

B. アザイガス (AZ) と比較したときにHO系統で有意に減少あるいは増加した代謝物の数  
HO/AZ の比較をする際には各 HO 系統 (1-HO, 7-HO, 8-HO) における代謝物の含量をそれぞれ対応する AZ 系統 (1-AZ, 7-AZ, 8-AZ) の値で除算した.



**Fig. 19** T<sub>3</sub>世代の *RNAi-SIGADall Red* 果実において2系統以上のHO系統で共通した変動を示した一次代謝物

A. WTと比較したときに2系統以上のホモ系統(HO)でみられた代謝物の変動

B. アザイガス(AZ)と比較したときに2系統以上のHO系統でみられた代謝物の変動  
 グラフの値は平均値(n=6)を示す。

アスタリスクはWTとHO系統あるいはWTとAZ間でStudent's *t*検定による有意差があることを示す(\**P*<0.05, \*\**P*<0.01)。MST, mass spectral tag (unidentified metabolite)。

## 第3章

### GABA 高含有トマトの作出

### 3-1 緒言

人体において GABA は抑制性の神経伝達物質として機能するだけでなく (Owens and Kriegstein 2002) , 経口摂取することで血圧上昇抑制効果やストレス緩和効果, 不眠, 抑うつ, 自律神経障害を改善する効果が得られることが明らかにされている (Okada et al. 2000; Inoue et al. 2003; Kajimoto et al. 2004; Abdou et al. 2006) . このことから, 近年では健康機能性成分としても高い関心が寄せられ, GABA を高濃度に添加した食品やサプリメントが数多く市場に流通するようになった. GABA の健康増進効果を得るためには 1 日 10-20 mg を目安に摂取することが望まれているが (Fukuwatari 2001; Kazami et al. 2002; Tsuchida et al. 2003; Inoue et al. 2003) , GABA を天然に高含有する食品は少なく, GABA 添加食品以外の通常の食事から必要量を摂取するのは困難である. そのため, 人々が日常的に食する様々な作物において GABA を高蓄積化する試みがなされている (Tsushida et al. 1987, Shimajiri et al. 2013a) . 本研究で対象としているトマトは他の蔬菜類と比較して GABA を多量に蓄積する種であるため (Matsumoto et al. 1997) , トマトにさらに高濃度の GABA を蓄積させることができれば, より少ない量から高濃度の GABA を摂取することが可能になると考えられる.

また, GABA 高含有トマトを作出することで, 第 1 章および第 2 章で明らかにすることができなかったトマト果実における GABA の生理機能を探る手がかりが得られる可能性が考えられる. 様々な植物種において, 過剰な GABA 蓄積が植物体の矮化や不稔, 葉の白色化といった表現型を引き起こすことが観察されているが (Baum et al. 1996; Bouché et al. 2003; Akama and Takaiwa 2007; Koike et al. 2013) , 果実における過剰な GABA 蓄積の影響は未だ明らかにされていない. そのため, GABA 高含有トマトを作出することができれば, 果実における GABA の機能を解明する上で有用な実験材料となるかもしれない. 第 1 章では, CaMV 35S プロモーターと NOS ターミネーターを用いて *SIGAD3* を過剰発現することで (*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*) , 赤熟果実内の GABA 含量を WT の 5.2 倍にまで高めることができた (Fig. 12D) . しかしながら, 作出した形質転換体の植物体や果実の形態・発達には異常はみられなかった (Fig. 15) . そのため, トマトにおける過剰な GABA 蓄積の影響を明らかにするためには, さらに GABA を高蓄積させる必要があると考えられる. そこで本章では, 第 1 章において GABA 蓄積の増加に有効であった *SIGAD3* を用い, *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* よりもさらに GABA を高蓄積するトマトの作出を目標とした.

植物の GAD のアミノ酸配列には、C 末に微生物や動物にはみられない伸長領域 (30-50 アミノ酸) が存在することが明らかにされている。この伸長領域はタンパク質として立体構造をとる際に自己阻害ドメインとして機能することが明らかにされており (Yap et al. 2003) , ペチュニアやイネの研究においてその伸長領域を切除することで GAD の活性が上昇することが報告されている (Baum et al. 1996; Akama and Takaiwa 2007) 。しかしながら、トマトの GAD における C 末伸長領域の機能は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、完全長の *SIGAD3* あるいは C 末の伸長領域切除した *SIGAD3* (*SIGAD3ΔC*) を過剰発現する組換えトマトを作出することで、C 末伸長領域の有無が GABA 含量に及ぼす影響を調査することとした。また、*SIGAD3* および *SIGAD3ΔC* の発現誘導には果実成熟期に誘導がかかる E8 プロモーター (Lincoln et al. 1987) と、植物細胞において外来遺伝子を高発現させる際に有効であることが報告されているシロイヌナズナのヒートショックプロテイン 18.2 (*HSP*) 遺伝子ターミネーター (Nagaya et al. 2010; Hirai et al. 2011b; Kurokawa et al. 2013) を用いることとした。

## 3-2 材料および方法

### 3-2-1 供試植物

供試植物にはトマト ‘Micro-Tom’ (トマト NBRP より分譲) を用いた。

### 3-2-2 コンストラクトの構築

E8プロモーターおよびHSPターミネーターの制御下で完全長の*SIGAD3*あるいはC末の87塩基を切除した*SIGAD3*を発現させるコンストラクトの構築を行った。植物バイナリーベクターには先行研究において作製されたE8プロモーター-ミラクリン遺伝子-HSPターミネーター (E8-MIR-HSP) コンストラクトを用いた。まず、制限酵素 (*Bam*HIおよび*Sac*I) を利用してE8-MIR-HSPプラスミドからミラクリン遺伝子 (MIR) を切り出した。続いて*Bam*HIサイトと*Sac*Iサイトをそれぞれ付加した遺伝子特異的プライマー (Table 4) を用いて、*SIGAD3*の完全長CDSあるいは*SIGAD3*の完全長CDSからC末の87塩基を切除した配列 (*SIGAD3ΔC*) をPCRにより増幅した。テンプレートには第1章で作出した*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*プラスミドを用いた。PCRの組成はKOD-plus (TOYOBO) 1 μl, 10×buffer (TOYOBO) 5 μl, 2 mM each dNTPs 5 μl, 25 mM MgSO<sub>4</sub> 3 μl, 10 μM Forward primer 1.5 μl, 10 μM Reverse primer 1.5 μl, 超純水32 μl, プラスミドDNA 1 μlの計50 μlと

し、反応条件は98°C; 2分の後, 98°C; 15秒, 60°C; 30秒, 68°C; 30秒を35サイクル行い, 最後に68°C; 10分の反応を行った. 得られたPCR産物は1%アガロースゲルと泳動バッファー1×TAE溶液を用いて電気泳動を行い, 目的サイズのバンドをゲル抽出した. ゲル抽出にはWizardR SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いた. その後, ミラクリン遺伝子を切り出したE8-/-HSPプラスミドとゲル精製したPCR産物をIn-Fusionクローニング反応 (Clontech) により融合させた. 操作は添付のプロトコールに従って行った. その後, (1-2-2) と同様の方法で塩基配列の確認を行い, エレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (GV2260株) に形質転換した. 作製したコンストラクトは以下, *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* と表記する (Fig. 20A) .

### 3-2-3 アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換

(1-2-4) と同様の方法で行った.

### 3-2-4 フローサイトメーターを用いた倍数性の確認

(1-2-5) と同様の方法で行った.

### 3-2-5 サザンブロット解析による導入遺伝子のコピー数調査

(1-2-6) と同様の方法で行った.

### 3-2-6 定量的 RT-PCR による発現解析

(1-2-7) と同様の方法で行った. 使用した遺伝子特異的プライマーは Table 4 に示した通りである. 内部標準には (1-2-7) と同様 *SIUbiquitin* 遺伝子を用いた. 反応条件は 95°C; 10 秒の後, 95°C; 5 秒, 60°C; 30 秒 (*SIGAD3* のみ 54°C; 30 秒) を 40 サイクル行った. サンプルには緑熟期, ブレーカー後 3 日目 (Br+3), ブレーカー後 10 日目 (Br+10) の果実を用いた. 尚, 'Micro-Tom' の WT 果実において, Br+3 および Br+10 はそれぞれオレンジ期, 赤熟期に相当する.

### 3-2-7 果実内アミノ酸含量の定量

緑熟期および Br+10 果実から (1-2-8) と同様の方法でアミノ酸を抽出し, (1-2-9) と同様の前処理をした後, 筑波大学分析センターのアミノ酸分析に委託した.

また, T<sub>0</sub>世代における果実内 GABA 含量のスクリーニングには, (1-2-8) に記載した GABase 酵素アッセイを実施した.

### 3-2-8 果実内リコペン含量の定量

Nagata and Yamashita (1992) の方法に従い, 果実内のリコペン含量を定量した. Br+10 の果実を収穫し, 種子とゼリーを除いた後, 液体窒素で凍結粉砕した. 凍結粉砕した果実サンプル 200 mg をガラスバイアルに入れ, 抽出溶媒 (アセトン:ヘキサン=4:6, v/v) 2 ml を加えてボルテックスした. その後, 数分間静置し, 透明になった上清を吸光度測定に用いた. 分光光度計を用いて試料溶液の 453 nm, 505 nm, 645 nm, 663 nm の吸光度 ( $A_{453}$ ,  $A_{505}$ ,  $A_{645}$ ,  $A_{663}$ ) を測定し, 以下の計算式に代入することでリコペン含量を算出した.

$$\text{リコペン (mg 100g FW}^{-1}\text{)} = (-0.0458 A_{663} + 0.204 A_{645} + 0.372 A_{505} - 0.0806 A_{453}) \times 10$$

### 3-2-9 エチレン生産量の測定

異なる発達ステージ (緑熟期, ブレーカー, Br+3, Br+10, Br+15) の果実を収穫し, 50 ml のガラス瓶に一果実ずつ入れ, 3 時間以上 (傷害エチレンの発生が抑まるまで) 静置した. その後, セプタム付きのふたで密封し, さらに 1 時間インキュベートした. シリンジを用いてヘッドスペースガスを 1 ml 採取し, ガスクロマトグラフ (GC-14B, Shimadzu) に注入することでエチレン濃度を測定した. 得られたエチレン濃度, 果実重, インキュベート時間からエチレン生産量 (速度) を算出した.

## 3-3 結果

### 3-3-1 GABA 高蓄積組換えトマトの作出

トマトへの形質転換は第 1 章と同様, アグロバクテリウム法により行い, 導入遺伝子を保持する系統を *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* に関しては 11 個体 (独立 9 系統), *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* に関しては 15 個体 (独立 12 系統) 獲得した (Fig. 20B) .

続いて, 得られた組換え体に関して *SIGAD3* ( $\Delta C$ ) の発現が増加していることを確認するため, Br+10 果実を用いて発現解析を行った. その結果, *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* (系統 8b, 9, A) および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* (系統 68, 140a, 153) において WT のおよそ 300 倍の発現増加がみられた (Fig. 21A) . これらの有望系統に関しては, *SIGAD3* の発現解析と

同一の果実サンプルを用いて GABA 含量の定量を行った。 *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* (系統 8b, 9, A) の GABA 含量は WT の 6-7 倍高い値を示し、12–15  $\mu\text{mol gFW}^{-1}$  であった (Fig. 21B) 。 一方、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* (系統 68, 140a, 153) の GABA 含量はさらに高く、23–26  $\mu\text{mol gFW}^{-1}$  を示した (Fig. 21B) 。 この値は WT の 11-12 倍、 *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* 系統と比較しても 1.9 倍高い値であった (Fig. 21B) 。

*E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実は WT と比較して表現型に大きな差はみられなかった (Fig. 22A) 。 一方、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実では WT よりも果皮の色が薄くなる (系統によって程度は異なるが黄色から濃いオレンジ色) 表現型がみられた (Fig. 22A) 。 Br+10 果実を用いてトマトの主要な赤色素であるリコペンの含量を測定したところ、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* では WT の 37–63%にまで有意に減少していた (Fig. 22B) 。

### 3-3-2 T<sub>1</sub> 世代の *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* 果実における *SIGAD3* 発現と遊離アミノ酸含量

T<sub>0</sub> 世代の解析で高い GABA 含量と着色異常がみられた *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* (系統 68, 140a, 153) に関しては、形質の安定性を確認するために T<sub>1</sub> 世代で再度解析を行った。 緑熟果実および Br+10 果実を用いて *SIGAD3* ( $\Delta$ C) の発現解析を行った結果、緑熟果実では系統 68 と 140a において WT よりも有意に高い発現がみられ、Br+10 果実では全 3 系統において更に高い発現 (WT の 800-1500 倍) が確認された (Fig. 23A) 。 続いて、緑熟果実および Br+10 果実内の GABA 含量をアミノ酸分析器により定量した。 WT の GABA 含量は緑熟から Br+10 ステージにかけて 82%の減少がみられたのに対し、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* では全 3 系統の Br+10 果実において緑熟果実を上回る高い GABA 含量 (19–29  $\mu\text{mol gFW}^{-1}$ ) が観察された (Fig. 23B) 。 その値は WT の Br+10 果実と比較すると 12-18 倍であった (Fig. 23B) 。 他の遊離アミノ酸についても定量を行った結果、緑熟果実では WT と *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* で大きな差はみられなかったものの (Table 5) , Br+10 果実では、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* においてアスパラギン酸とグルタミン酸の含量に著しい低下がみられた (アスパラギン酸: WT の 5-12%、グルタミン酸: WT の 5-9%; Table 6) 。 また、 *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実では、アラニン、システイン、フェニルアラニンの含量が WT よりも有意に増加していたが、これらアミノ酸の総遊離アミノ酸に占める割合は 6%以下であった (Table 6) 。 一方、GABA に関しては *E8-SIGAD3 $\Delta$ C-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実において総遊離アミノ酸の 72-81%を占めていた (Table 6) 。 この割合は



WT の Br+10 ステージ (6.2%; Table 6) だけでなく GABA が最も高くなる緑熟期 (33%; Table 5) の値と比較しても大幅に増加していた。

### 3-3-3 T<sub>1</sub>世代の *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*における果実着色

T<sub>1</sub>世代の *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* (系統 68, 140a, 153) に関して生育調査を行ったところ, WT と比較して草丈, 到花日数, 開花から Br ステージまでに要した日数, 果実重に顕著な差はみられなかった (Fig. 24) . しかしながら, 果実の着色に関しては T<sub>0</sub>世代と同様の表現型がみられ, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実は黄色から濃いオレンジ色を呈していた (Fig. 25A) . また, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は Br+30 ステージまで樹上で成熟させても完全には赤くならなかった (Fig. 25B) . しかしながら, Br+30 ステージの果実の中を観察してみると, WT と同様, 果実の中で種子が発芽している系統がみられた (Fig. 25B) . このことから, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は着色に異常があるものの, 種子の成熟は正常であることが示唆された. また, WT と *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実を用いてリコペン含量を測定した結果, T<sub>0</sub>世代と同様, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* において減少傾向がみられ, その値は WT の 28-57%であった (Fig. 25C) .

### 3-3-4 *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実におけるエチレン生産の特性

植物ホルモンの一種であるエチレンは果実成熟において重要な役割を果たすと考えられており, エチレン生合成を阻害したトマト果実では軟化や香り成分の合成, 着色といった本来誘導されるはずの果実成熟プロセスが抑制されることが知られている (Oeller et al. 1991; Klee et al. 1991) . そこで, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実でみられたリコペン含量の減少がエチレン生産の抑制に起因するかを調査するため, WT と *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実 (緑熟, ブレーカー, Br+3, Br+10, Br+15 ステージ) を用いてエチレン生産量を測定した. WT の果実では, 緑熟ステージではほとんどエチレンは検出されず, 果実着色を開始したブレーカーステージにおいてエチレン生産の増加がみられた (Fig. 26A) . その後, 果実がオレンジ色を呈する Br+3 ステージで最大に達し, 赤熟とともに減少した (Fig. 26A) . 一方, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実では, WT と同様にブレーカーステージにおいてエチレン生産量の増加がみられたものの, その増加率は緩やかで Br+10 ステージに最大に達した (Fig. 26A) . しかしながら, Br+10 ステージにおける *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* のエチレン生産量は Br+3 ステージの WT とほぼ同等であっ

た (Fig. 26A) .

*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実でみられたエチレン生産ピークの遅れがエチレン生合成遺伝子の発現抑制によるものかを調査するため、果実成熟期のエチレン生産に重要とされる *ACS2*, *ACS4*, *ACO1* 遺伝子 (Van de Poel et al. 2012) の発現解析を行った. WT の果実における *ACS2*, *ACS4*, *ACO1* の発現量は、エチレン生産量の推移と相関するように Br+3 ステージで最大となり、その後、減少した (Fig. 26B) . 一方、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実では、系統 153 における *ACO1* の発現のみ Br+3 で最大となったものの、それ以外の発現は全て Br+10 で最大となった (Fig. 26B) .

### 3-3-5 *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実におけるカロテノイド生合成遺伝子の発現

(3-3-4) の解析から、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実では果実成熟期のエチレン生産の増大に遅れがみられるものの、Br+10 ステージには WT のピーク時とほぼ同量のエチレンが生産されていることが明らかとなった (Fig. 26A) . しかしながら、(3-3-3) で示した通り、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は Br+30 ステージにおいても完全には赤くはならなかった (Fig. 25B) . そこで、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実でみられる着色異常の原因を探るため、カロテノイド生合成に関わる *PSY1*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* 遺伝子 (Liu et al. 2015) の発現解析を行った. WT の果実における *PSY1*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* 遺伝子の発現量は、いずれも Br+3 ステージで最大となり、その後、減少した (Fig. 27A) . 一方、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実では、いずれの遺伝子発現量も Br+3 ステージでは低く、Br+10 ステージにおいてもわずかに増加するのみであった (Fig. 27A) .

続いて、同じ果実サンプルを用い、果実成熟に関わる転写因子 *RIN*, *TAGL1*, *FUL1* (*TDR4*), *FUL2* (*MBP7*) の発現解析も行った. その結果、WT の果実ではいずれの遺伝子も緑熟から Br+3 ステージにかけて発現の増加がみられたのに対し (Fig. 27B) , *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実では *RIN* の発現のみ Br+10 ステージで WT と同じレベルにまで増加したものの、*TAGL1*, *FUL1*, *FUL2* の発現は緑熟から Br+10 ステージにかけてほとんど増加がみられなかった (Fig. 27B) .

## 3-4 考察

第 1 章においてトマト果実における GABA の生合成には緑色期に発現する *SIGAD2* および *SIGAD3* の発現が重要であること、また先行研究においてトマト果実における

GAD の酵素活性は緑色期に高く、赤色期には検出されなことが明らかにされている (Akihiro et al. 2008; Sorrequieta et al. 2010) . 果実内の GABA 含量はこれら GAD の mRNA 発現量と酵素活性に同調するよう、緑色期に増加し、赤色期には減少する (Rolin et al. 2000; Akihiro et al. 2008) . このことから、赤色期に GAD の mRNA 発現量あるいは GAD 活性を高めることができれば、赤熟果実において GABA をさらに高蓄積させることが可能になると考えられる. 第 1 章では CaMV 35S プロモーターと NOS ターミネーターを用いて *SIGAD3* の過剰発現トマトを作出し (*35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>*) , 赤熟果実において WT の 5.2 倍量の GABA 蓄積を確認した (Fig. 12D) . このことから、*SIGAD3* の過剰発現はトマト果実の GABA 蓄積を向上させる上で有効な手段であることが分かった. 本章ではトマト果実にさらに高濃度の GABA を蓄積させることを目指し、*SIGAD3* の遺伝子発現や酵素活性をより効果的に高める新たな手法の検討を行った.

第 1 章で作出した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* とは異なる点として、本章ではまず、発現カセットの改変を行った. タバコ、イネ、トマトの研究において、シロイヌナズナ由来の HSP ターミネーターが NOS ターミネーターよりも導入遺伝子を高発現させるのに有効であることが実証されている (Nagaya et al. 2010; Hirai et al. 2011b; Kurokawa et al. 2013) . そのため、本研究でも *SIGAD3* の発現誘導において HSP ターミネーターを用いた. また、植物体全身での GABA の高蓄積化は植物体の生長や稔性に異常をもたらすことが報告されているため (Palanivelu et al. 2003; Akama and Takaiwa 2007; Koike et al. 2013) , 本研究では果実成熟期に特異的に誘導がかかる E8 プロモーターを用いた. 一般に E8 プロモーターを用いた場合には、赤色果実における mRNA の発現誘導レベルは CaMV 35S プロモーターと比較すると低くなる傾向がある (Nambeesan et al. 2010; Hirai et al. 2011a) . しかしながら、本章で作出した *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* の果実では Br+10 ステージにおいて WT の 300 倍以上高い *SIGAD3* 発現がみられた (Fig. 21A) . この発現増加量は第 1 章で作出した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* (赤熟果実において WT の 200-280 倍; Fig. 12C) をも上回る結果となった. しかしながら、*E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実における GABA 含量は *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* の赤熟果実とほぼ同等であった (Figs. 12D, 21B) . 以上の結果より、果実内 GABA 含量は *SIGAD3* の発現量のみには依存しないことが示唆されたが、E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットが赤熟期のトマト果実における *SIGAD3* の高発現化に有効であることが明らかとなった.

イネやタバコにおいて、C末に存在する自己阻害ドメインを切除したGADを発現させることで、細胞内のGABA含量が増加することが報告されている (Baum et al. 1996; Akama and Takaiwa 2007) . そのため、本章では2つ目のアプローチとしてSIGAD3のC末切除によるGABA蓄積への影響を調査した. *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*のBr+10果実におけるSIGAD3 (ΔC) の発現量は*E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>*とほぼ変わらず、WTの約300倍に増加した (Fig. 21A) . しかしながら、Br+10果実におけるGABA含量は*E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>*よりも*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*の方が1.9倍高い結果となった (Fig. 21B) . 使用したプロモーター、ターミネーターが同一で、かつSIGAD3 (ΔC) 発現量が同程度であったにも関わらず*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*では*E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>*と比較してGABA含量が増加したことから、他の植物種と同様、SIGAD3のC末伸長領域にも自己阻害ドメインとして機能が備わっている可能性が考えられる. GADのC末伸長領域の自己阻害機能に関しては、シロイヌナズナにおいて以下のようなモデルが提唱されている (Gut et al. 2009) . まず、GADのC末伸長領域は生体pH (>6.9) においては活性中心を覆うような構造をとり、GAD活性は阻害された状態にあると考えられている. しかしながら、pHの低下 (<5.8) やC末伸長領域へのCa<sup>2+</sup>/CaMの結合により立体構造が変化すると、活性中心が露出し、結果的に酵素活性が上昇すると推察されている (Gut et al. 2009). SIGAD3においても同様のメカニズムが存在すると仮定すると、C末伸長領域を切除したことで活性中心を覆う立体構造をとることができず、常に活性化状態となり、結果的にGABAの生産量が増加したのではないかと考えられる. C末を切除したペチュニアのGADをタバコで発現させた例では、正常なGADを発現させた組換え体と比較して葉では1.2倍、茎では2.5倍のGABA蓄積がみられ (Baum et al. 1996) , また、イネのGAD (*OsGAD2*) をタバコで発現させた例では、C末を切除していないGADを発現させた組換え体と比較して葉で0.93倍、茎で17倍、根では46倍に増加することが報告されている (Akama and Takaiwa 2007) . これらの結果から、GADのC末伸長領域の切除によるGABA蓄積の促進効果は、植物種や器官によって異なると考えられ、それはおそらくGADの活性化に加え、細胞内の環境 (基質の濃度や他の制御因子の有無など) の違いが影響していると推察される.

また、高いGABA蓄積能力を示した*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*に関しては、その安定性を確認するため、T<sub>1</sub>世代においても再度解析を行った. その結果、T<sub>1</sub>世代の*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*果実においてもBr+10ステージでSIGAD3 (ΔC) 発現量の著しい増

加がみられ、それに付随して GABA 含量も  $19\text{--}29 \mu\text{mol gFW}^{-1}$  にまで増加した (Fig. 23A, B) . この GABA 含量は第 1 章で作出した *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* や先行研究において作出された *SIGABA-T1* の発現抑制組換えトマトを上回る結果となった (Koike et al. 2013) . また、果実成熟期特異的な E8 プロモーターを用いたにも関わらず、系統 68 と 140a の緑熟果実において、*SIGAD3 (ΔC)* 発現の有意な増加がみられた (Fig. 23A) . 同様の傾向は、味覚修飾タンパク質であるミラクリン遺伝子を E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットを用いて過剰発現させた組換えトマトにおいても観察されており (Kurokawa et al. 2013) , HSP ターミネーターによる遺伝子発現の強化が E8 プロモーターによる果実成熟期特異的な発現誘導に異常をもたらしたのではないかと推察されている (Kurokawa et al. 2013) .

また、Br+10 果実において、GABA が総遊離アミノ酸に占める割合は WT で 6.2%であったのに対し、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* では最大で 81%に達した (Table 6) . 反対に、WT の Br+10 果実において最も存在比の多いアスパラギン酸とグルタミン酸の含量は、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* において著しく減少した (Table 6) . グルタミン酸は GABA の前駆体であり、GAD の基質として利用されるため、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実におけるグルタミン酸含量の減少は、C 末の自己阻害ドメインの切除によって強化された GAD 活性によるグルタミン酸から GABA への変換に起因すると考えられる . 一方、アスパラギン酸は GABA の直接的な前駆体ではないが、主にグルタミン酸を基質としてアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (ASP-AT; Fig. 1) の働きによって合成されるため、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実におけるアスパラギン酸含量の減少は、基質となるグルタミン酸の欠乏に起因すると考えられる .

本章で作出した *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* は WT と類似した赤熟果実を实らせたが、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は WT では赤くなる Br+10 ステージにおいても黄色あるいはオレンジ色を呈していた (Figs. 22A, 25A) . このことから、GABA の過剰蓄積が果実着色に影響を及ぼしたと考えられた . また、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実における着色異常はリコペン含量の減少と (Figs. 22B, 25C) , カロテノイド生合成関連遺伝子 (*PSY1*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*) の発現抑制を伴っていた (Fig. 27A) . トマト果実において、成熟時にみられるエチレン生産の増加は果実成熟やカロテノイド蓄積を促進するのに重要な役割を果たすと考えられている (Oeller et al. 1991; Klee et al. 1991; Wilkinson et al. 1997) . そ

のため、本研究では *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* と WT の果実について成熟期のエチレン生産量の測定を行った。その結果、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実ではエチレン生産の増加が緩やかであったものの、Br+10 ステージには WT のピーク時 (Br+3) と同程度のエチレン生産量に達することが分かった (Fig. 26A)。*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実でみられたエチレン生産速度の遅れは、少なくとも部分的にはエチレン生合成遺伝子である *ACS2* と *ACS4* の発現と関連しているように見えた (Fig. 26A, B)。このことから、トマト果実における GABA の過剰蓄積はエチレン生合成遺伝子の転写量を制御することでエチレン生産量に影響を及ぼすことが示唆された。一方、ヒマワリや *Stellaria longipes* における研究では、外生の GABA を添加することで ACS の転写量が増加し、結果的にエチレン生産量が増加するという、本研究とは対照的な現象が報告されている (Kathiresan et al. 1997, 1998)。従って、高濃度の GABA がエチレン生産に及ぼす影響は植物種によって異なる可能性がある。

*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は、Br+10 ステージには WT の Br+3 と同程度の高いエチレン生産がみられたにも関わらず、Br+30 ステージになっても完全には赤くならなかった (Figs. 25B, 26A)。エチレン非感受性のトマト変異体 [*Sletr1*, *Never ripe (Nr)*, *ripening inhibitor (rin)*] やエチレン生合成を抑制した組換えトマトにおいても果実の着色異常が報告されている (Oeller et al. 1991; Alba et al. 2005; Okabe et al. 2011)。そのため、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実における着色異常はエチレン生産ピークの遅れだけでなく、エチレン感受性の低下も起因しているかもしれない。

トマトの果実成熟は、エチレンだけでなく MADS-box 転写因子によっても制御されることが知られている。例えば、RIN は果実成熟の制御に関わるエチレン依存的、非依存的な経路の最も上流で働く転写因子であることが示唆されている (Fujisawa et al. 2013)。また、近年同定された TAGL1, FUL1, FUL2 もまた、エチレン生合成やリコペン蓄積など果実成熟に関わるプロセスを制御する転写因子であることが明らかにされつつある (Itkin et al. 2009; Bemer et al. 2012; Shima et al. 2013; Fujisawa et al. 2014)。そのため、本研究では着色異常がみられた *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実において、これら転写因子の発現解析を行った。その結果、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実では WT と比較して RIN の発現が Br+3 ステージで、TAGL1, FUL1, FUL2 の発現は Br+3 および Br+10 ステージで抑制されていることが分かった (Fig. 27B)。これら 4 つの転写因子 (RIN, TAGL1, FUL1,

FUL2) はいずれも *ACS2* 遺伝子のプロモーター領域に結合することが報告されている (Itkin et al. 2009; Fujisawa et al. 2011; Shima et al. 2013) . そのため, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実でみられた *ACS2* 遺伝子の発現抑制は (Fig. 26B) , これら転写因子の遺伝子発現量の低下に起因しているかもしれない. 同様に, カロテノイド生合成関連遺伝子である *PSYI* と *CRTISO* はそれぞれ *RIN*, *FUL1* あるいは *RIN*, *FUL1*, *FUL2* のターゲット遺伝子であることが報告されている (Fujisawa et al. 2014) . そのため, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実ではこれら転写因子の発現量の低下がカロテノイド生合成遺伝子の発現量に影響を及ぼした可能性が考えられる (Fig. 27 A, B) . *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実において何故 *RIN*, *TAGL1*, *FUL1*, *FUL2* の遺伝子発現が抑制されたのか, そのメカニズムの解明には至らなかったが, GABA の過剰蓄積は果実成熟に関わる複数の遺伝子発現量を変化させ, 結果的に果実成熟のプロセスを変化させることが明らかとなった.

興味深いことに, *FUL1* および *FUL2* を同時に抑制した組換えトマトではエチレンが正常に生産されるものの, リコペン含量の減少を伴うオレンジ色の果実を形成することが報告されている (Bemer et al. 2012) . さらにこの組換えトマトの果実では3つの *SIGAD* 遺伝子 (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) の発現が全て増加しており, GABA 含量の増加 (WT の2倍) とグルタミン酸含量の減少 (WT の1/8) が観察されている (Bemer et al. 2012) . そのため, 本研究で作出した *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 果実においても, GABA の過剰蓄積による *FUL1/2* の遺伝子発現抑制が, *FUL1/2* 抑制組換え体と類似した表現型をもたらした可能性も考えられる.

また, 別の可能性として GABA の過剰蓄積ではなく C 末の切除が着色異常をもたらしている可能性も考えられる. 本研究で着色異常がみられたのは *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実のみであり, *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* や *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* の果実は全て WT と同様の赤色を呈した (Fig. 22A) . 他の植物種の研究において, *GAD* の C 末伸長領域は  $Ca^{2+}/CaM$  と相互作用し *GAD* の活性制御に関わることが明らかにされている (Baum et al. 1993; Yap et al. 2003) . しかしながら, 実際にはこれら以外にも植物体の正常な発達に必要な制御に関わっているのかもしれない. 実際に, C 末を切除した *GAD* を発現させたタバコやイネの研究においても, GABA の蓄積とともに矮化, 葉の白色化, 不稔など植物体の生長にシビアな異常が現れている (Baum et al. 1996; Akama and Takaiwa 2007) . 従って, これらの表現型も GABA の過剰蓄積ではなく C 末を切除したことが影響している可能性も考えられる.

以上より、本章では E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットと *SIGAD3* の C 末切除を組み合わせることによって、トマト果実内の GABA 蓄積を飛躍的に高められることを明らかにした。また、トマト果実において、GABA の蓄積が果実成熟の制御に影響を及ぼす可能性が示唆された。



**Table 4** 使用したプライマーのリスト

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Note
SIGAD3-F (SIGAD3ΔC-F)	<u>GCAAAAGAAG</u> <b>GGATCC</b> ATGGTTCTCTCAA AAACTCCTTCTG	Used for vector construction. The last 10 bases of the E8 promoter sequence (Underlined) and the <i>Bam</i> HI site (Bold letters) were added.
SIGAD3-R	<u>CTTCATCTTCATAT</u> <b>GAGCTC</b> CTAACAAATAG ATGCTTT	Used for vector construction. The first 14 bases of the HSP terminator sequence (Underlined) and the <i>Sac</i> I site (Bold letters) were added.
SIGAD3ΔC-R	<u>CTTCATCTTCATAT</u> <b>GAGCTC</b> ATTGATCATCA AATTATCCTCCAC	Used for vector construction. The first 14 bases of the HSP terminator sequence (Underlined) and the <i>Sac</i> I site (Bold letters) were added.
SIUbiquitin-F SIUbiquitin-R	CACCAAGCCAAAGAAGATCA TCAGCATTAGGGCACTCCTT	Used for qRT-PCR of <i>SIUbiquitin</i> (Takayama et al. 2015)
SIGAD3-F SIGAD3-R	CAGGACGTTTCAATATAATC CCTACGGAGGGTCTCAGAG	Used for qRT-PCR of <i>SIGAD3</i> (Takayama et al. 2015)
ACS2-F ACS2-R	GGAGGTTTCGTAGGTGTTGAG TAATGGTGAGGGAGGAATAGGT	Used for qRT-PCR of <i>ACS2</i> (Mantelin et al. 2013)
ACS4-F ACS4-R	AACAAGCACAATGGAAGAGGA CGCACTACGAGCAAGGAAT	Used for qRT-PCR of <i>ACS4</i> (Mantelin et al. 2013)
ACO1-F ACO1-R	ACCATGTCCTAAGCCCGATTT ATTCGTGTCCTCCGTCTGTTTGT	Used for qRT-PCR of <i>ACO1</i> (Shinozaki et al. 2015)
PSY1-F PSY1-R	AACTTGTTGATGGCCCAAAC CTGTATCGGACAAAGCACCA	Used for qRT-PCR of <i>PSY1</i> (Ariizumi et al. 2014)
PDS-F PDS-R	AGCCGGTGACTACACGAAAC GCTTGCTTCCGACAACTTCT	Used for qRT-PCR of <i>PDS</i> (Ariizumi et al. 2014)
ZDS-F ZDS-R	CATGTCAAAGGCCACTCAGA ACGGTAACAACAGGCACTCC	Used for qRT-PCR of <i>ZDS</i> (Ariizumi et al. 2014)
CRTISO-F CRTISO-R	CCTGGGAATGCCTTTCAATA AACTCAGCTGCAACACGATG	Used for qRT-PCR of <i>CRTISO</i> (Ariizumi et al. 2014)
RIN-F RIN-R	ATGGCATTGTGGTGAGCAAAG GTTGATGGTGCTGCATTTTCG	Used for qRT-PCR of <i>RIN</i> (Shima et al. 2013)
TAGL1-F TAGL1-R	TGCCTGTAAATCTCCTGGAACC AGAATACCTGCTCCATGATTATCAGA	Used for qRT-PCR of <i>TAGL1</i> (Itkin et al. 2009)
FUL1-F FUL1-R	CAACAACCTGGACTCTCCTCACCTT TCCTTCCACTTCCCATTATCTATT	Used for qRT-PCR of <i>FUL1</i> (Shima et al. 2013)
FUL2-F FUL2-R	CACACCCCTTTAACAATCTTCACA CGGATGATCCTTCTACTTCTCCAT	Used for qRT-PCR of <i>FUL2</i> (Shima et al. 2013)

**Table 5** *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の MG 果実における遊離アミノ酸含量 (μmol gFW<sup>-1</sup>)

Amino acid	WT	<i>E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup></i>		
		68	140a	153
Alanine	0.34 ± 0.09 (1.3)	0.36 ± 0.06 (0.9)	0.32 ± 0.03 (0.9)	0.20 ± 0.02 (0.8)
Asparagine	1.90 ± 0.03 (7.1)	2.65 ± 0.38 (7.0)	2.39 ± 0.17 (6.7)	0.79 ± 0.12** (3.2)
Aspartate	1.57 ± 0.17 (5.9)	1.97 ± 0.26 (5.2)	1.81 ± 0.10 (5.0)	0.81 ± 0.04* (3.3)
Cysteine	0.00 ± 0.00 (0.0)	0.00 ± 0.00 (0.0)	0.00 ± 0.00 (0.0)	0.00 ± 0.00 (0.0)
GABA	8.76 ± 0.24 (32.9)	14.04 ± 1.79 (37.1)	14.96 ± 0.14** (41.6)	16.75 ± 2.13 (68.1)
Glutamate	1.12 ± 0.00 (4.2)	1.27 ± 0.16 (3.4)	1.22 ± 0.06 (3.4)	0.58 ± 0.04** (2.4)
Glutamine	10.14 ± 0.89 (38.1)	13.59 ± 2.63 (35.9)	11.16 ± 0.85 (31.0)	3.34 ± 0.37** (13.6)
Glycine	0.11 ± 0.02 (0.4)	0.14 ± 0.03 (0.4)	0.13 ± 0.01 (0.3)	0.10 ± 0.01 (0.4)
Histidine	0.17 ± 0.01 (0.6)	0.21 ± 0.01 (0.5)	0.21 ± 0.01 (0.6)	0.12 ± 0.01 (0.5)
Isoleucine	0.26 ± 0.05 (1.0)	0.40 ± 0.07 (1.1)	0.42 ± 0.07 (1.2)	0.18 ± 0.03 (0.7)
Leucine	0.17 ± 0.03 (0.6)	0.24 ± 0.03 (0.6)	0.28 ± 0.04 (0.8)	0.10 ± 0.02 (0.4)
Lysine	0.11 ± 0.01 (0.4)	0.20 ± 0.02* (0.5)	0.21 ± 0.04 (0.6)	0.07 ± 0.02 (0.3)
Methionine	0.02 ± 0.00 (0.1)	0.02 ± 0.00 (0.1)	0.02 ± 0.00* (0.1)	0.01 ± 0.00* (0.0)
Phenylalanine	0.18 ± 0.03 (0.7)	0.28 ± 0.04 (0.7)	0.33 ± 0.08 (0.9)	0.21 ± 0.04 (0.9)
Serine	0.55 ± 0.06 (2.1)	0.65 ± 0.08 (1.7)	0.65 ± 0.07 (1.8)	0.42 ± 0.03 (1.7)
Threonine	0.52 ± 0.05 (1.9)	0.70 ± 0.10 (1.9)	0.62 ± 0.03 (1.7)	0.44 ± 0.06 (1.8)
Tyrosine	0.16 ± 0.02 (0.6)	0.23 ± 0.02 (0.6)	0.29 ± 0.03* (0.8)	0.14 ± 0.04 (0.6)
Valine	0.40 ± 0.08 (1.5)	0.66 ± 0.14 (1.7)	0.65 ± 0.09 (1.8)	0.21 ± 0.02 (0.9)
<b>Total</b>	<b>26.64 ± 1.49 (100)</b>	<b>37.85 ± 5.42 (100)</b>	<b>35.94 ± 1.67 (100)</b>	<b>24.59 ± 2.81 (100)</b>

値は平均値±SE (n=3) を示す.

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01).

括弧内の数値は総遊離アミノ酸に対する割合 (%) を示す.

**Table 6** *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の Br+10 果実における遊離アミノ酸含量 (μmol gFW<sup>-1</sup>)

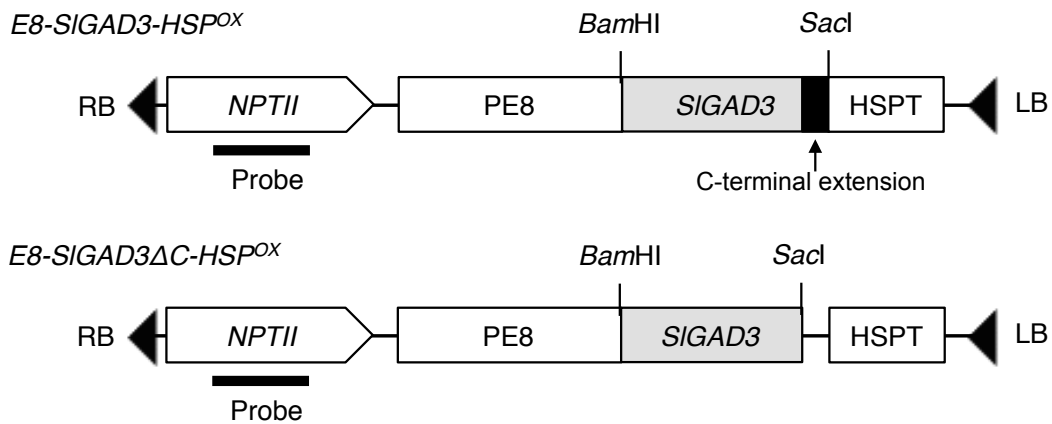
Amino acid	WT	<i>E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup></i>		
		68	140a	153
Alanine	0.41 ± 0.00 (1.6)	1.10 ± 0.06** (4.3)	1.02 ± 0.06* (2.7)	0.79 ± 0.08* (2.2)
Asparagine	1.24 ± 0.07 (4.9)	0.70 ± 0.05** (2.7)	1.07 ± 0.07 (2.9)	0.63 ± 0.03** (1.8)
Aspartate	14.39 ± 0.43 (56.6)	1.78 ± 0.12** (6.9)	2.36 ± 0.07** (6.3)	1.05 ± 0.27** (3.0)
Cysteine	0.01 ± 0.01 (0.0)	0.06 ± 0.00** (0.2)	0.08 ± 0.01** (0.2)	0.06 ± 0.00** (0.2)
GABA	1.58 ± 0.25 (6.2)	18.70 ± 0.78** (72.5)	26.87 ± 2.12** (72.1)	28.56 ± 1.69** (80.7)
Glutamate	2.00 ± 0.07 (7.9)	0.17 ± 0.01** (0.7)	0.25 ± 0.00** (0.7)	0.15 ± 0.02** (0.4)
Glutamine	4.24 ± 0.13 (16.7)	1.85 ± 0.15** (7.2)	3.78 ± 0.40 (10.1)	1.97 ± 0.22** (5.6)
Glycine	0.04 ± 0.00 (0.1)	0.10 ± 0.01 (0.4)	0.10 ± 0.01** (0.3)	0.09 ± 0.01* (0.2)
Histidine	0.17 ± 0.00 (0.7)	0.12 ± 0.01* (0.4)	0.18 ± 0.00 (0.5)	0.15 ± 0.00* (0.4)
Isoleucine	0.05 ± 0.01 (0.2)	0.06 ± 0.01 (0.2)	0.11 ± 0.02* (0.3)	0.12 ± 0.02* (0.3)
Leucine	0.09 ± 0.00 (0.4)	0.06 ± 0.01** (0.2)	0.06 ± 0.01 (0.2)	0.08 ± 0.01 (0.2)
Lysine	0.16 ± 0.01 (0.6)	0.06 ± 0.01** (0.2)	0.10 ± 0.01** (0.3)	0.10 ± 0.01* (0.3)
Methionine	0.02 ± 0.00 (0.1)	0.03 ± 0.01 (0.1)	0.05 ± 0.00** (0.1)	0.05 ± 0.01** (0.2)
Phenylalanine	0.16 ± 0.02 (0.6)	0.27 ± 0.01* (1.1)	0.36 ± 0.01** (1.0)	0.53 ± 0.01** (1.5)
Serine	0.29 ± 0.02 (1.1)	0.32 ± 0.02 (1.2)	0.31 ± 0.01 (0.8)	0.29 ± 0.02 (0.8)
Threonine	0.19 ± 0.01 (0.8)	0.18 ± 0.02 (0.7)	0.27 ± 0.02* (0.7)	0.34 ± 0.04* (1.0)
Tyrosine	0.02 ± 0.00 (0.1)	0.01 ± 0.00 (0.1)	0.03 ± 0.00 (0.1)	0.04 ± 0.00** (0.1)
Valine	0.27 ± 0.01 (1.1)	0.20 ± 0.00** (0.8)	0.25 ± 0.02 (0.7)	0.31 ± 0.01* (0.9)
<b>Total</b>	<b>25.44 ± 0.74 (100)</b>	<b>25.79 ± 1.23 (100)</b>	<b>37.28 ± 1.92 (100)</b>	<b>35.41 ± 1.07 (100)</b>

値は平均値±SE (n=3) を示す.

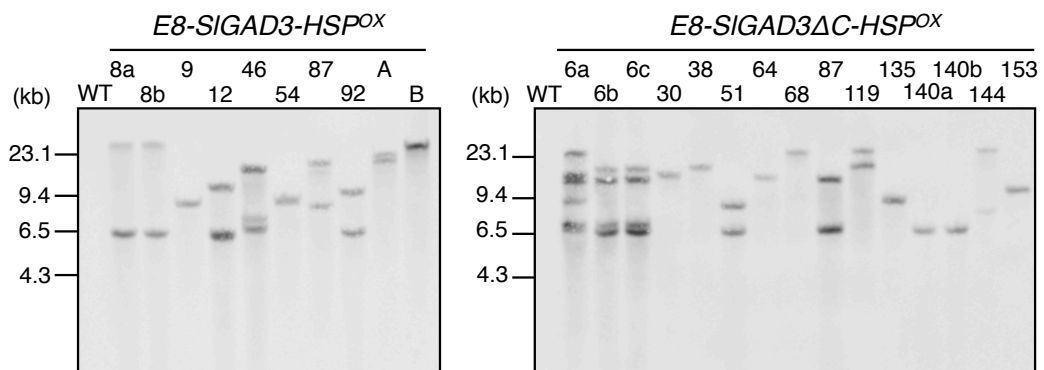
アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01).

括弧内の数値は総遊離アミノ酸に対する割合 (%) を示す.

A



B

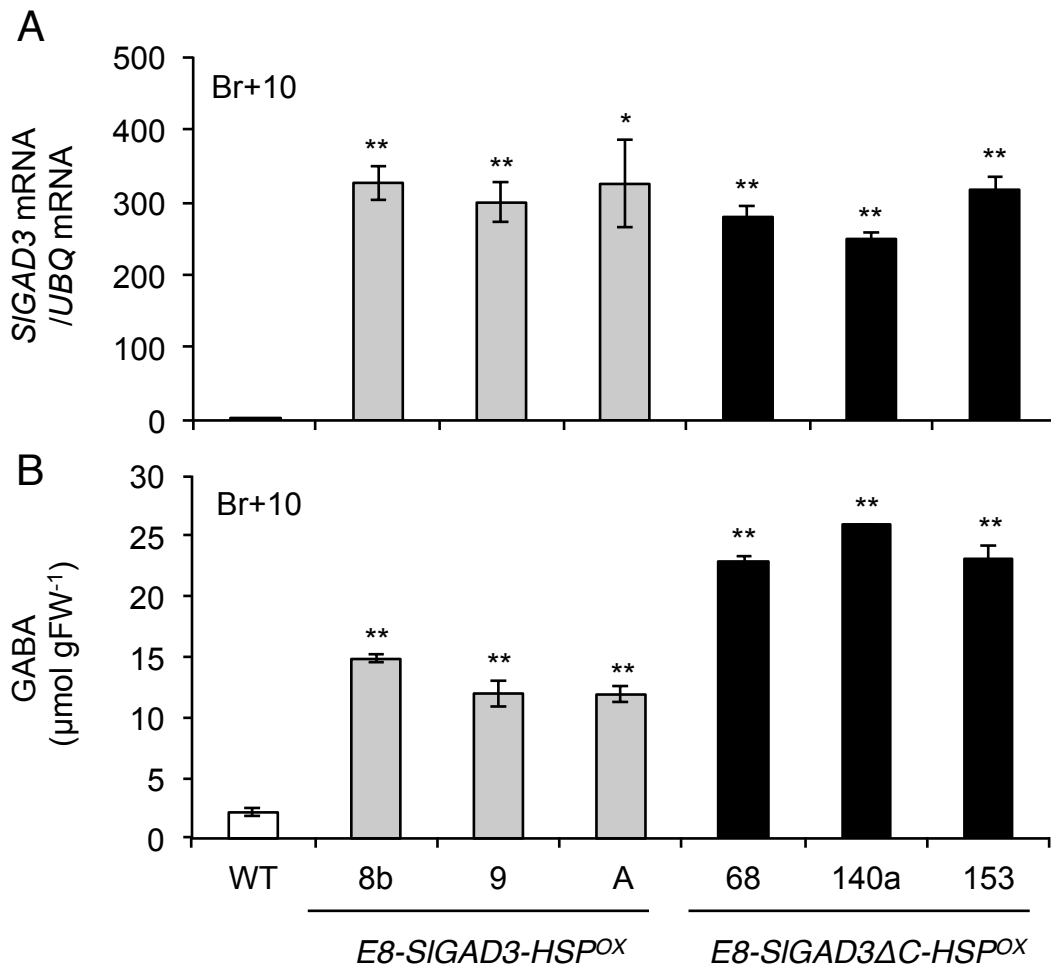


**Fig. 20** *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 形質転換体の作出に用いた  
 コンストラクトとサザンブロット解析

A. *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 形質転換体のコンストラクト

B. *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 形質転換体のサザンブロット解析 (T<sub>0</sub> 世代)

LB, left border; RB, right border; *NPTII*, neomycin phosphotransferase II (カナマイシン耐性遺伝子);  
 PE8, E8 promoter; HSPT, heat shock protein terminator; probe, サザンブロット解析に使用したプローブの領域.

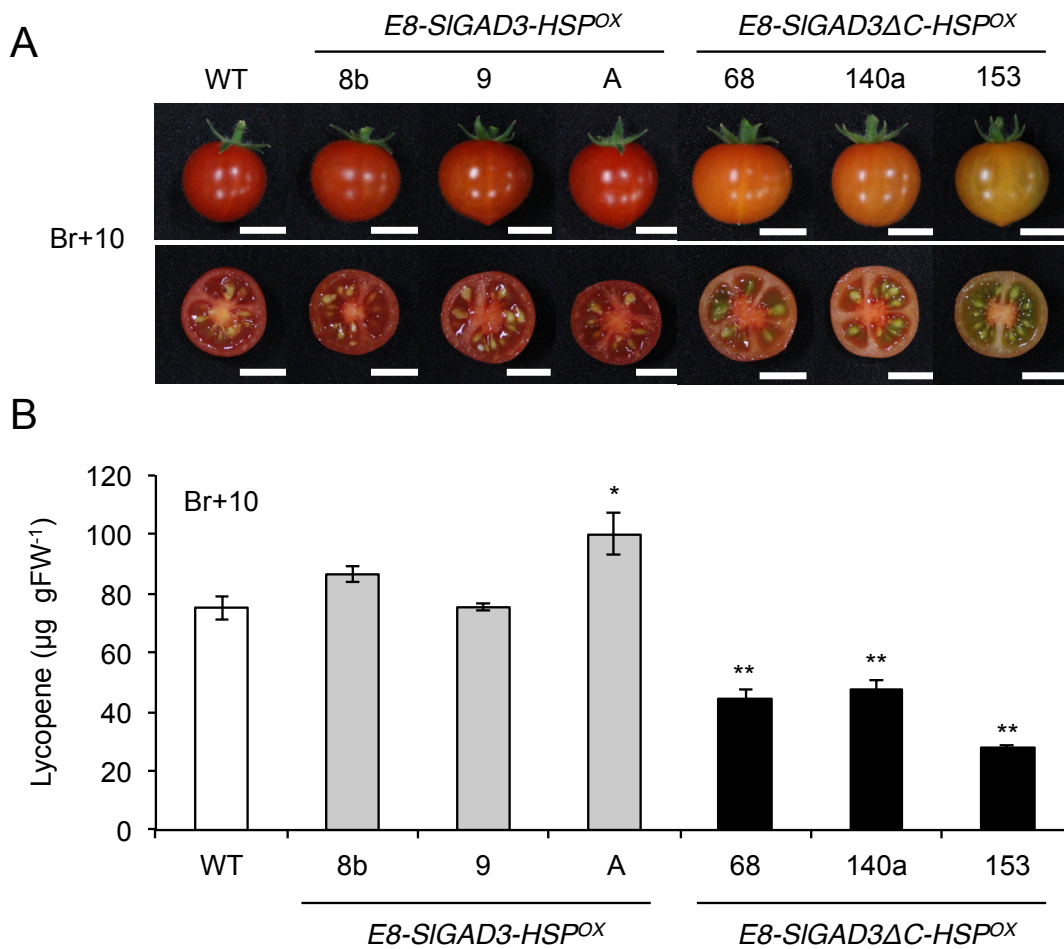


**Fig. 21** *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 ( $T_0$  世代) の Br+10 果実における *SIGAD3* 遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量

A. Br+10 果実における *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)

B. Br+10 果実における GABA 含量

qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。グラフの値は平均値 $\pm$ SE (n=3) を示す。アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01). FW, fresh weight; Br+10, ブレーカー後 10 日目。



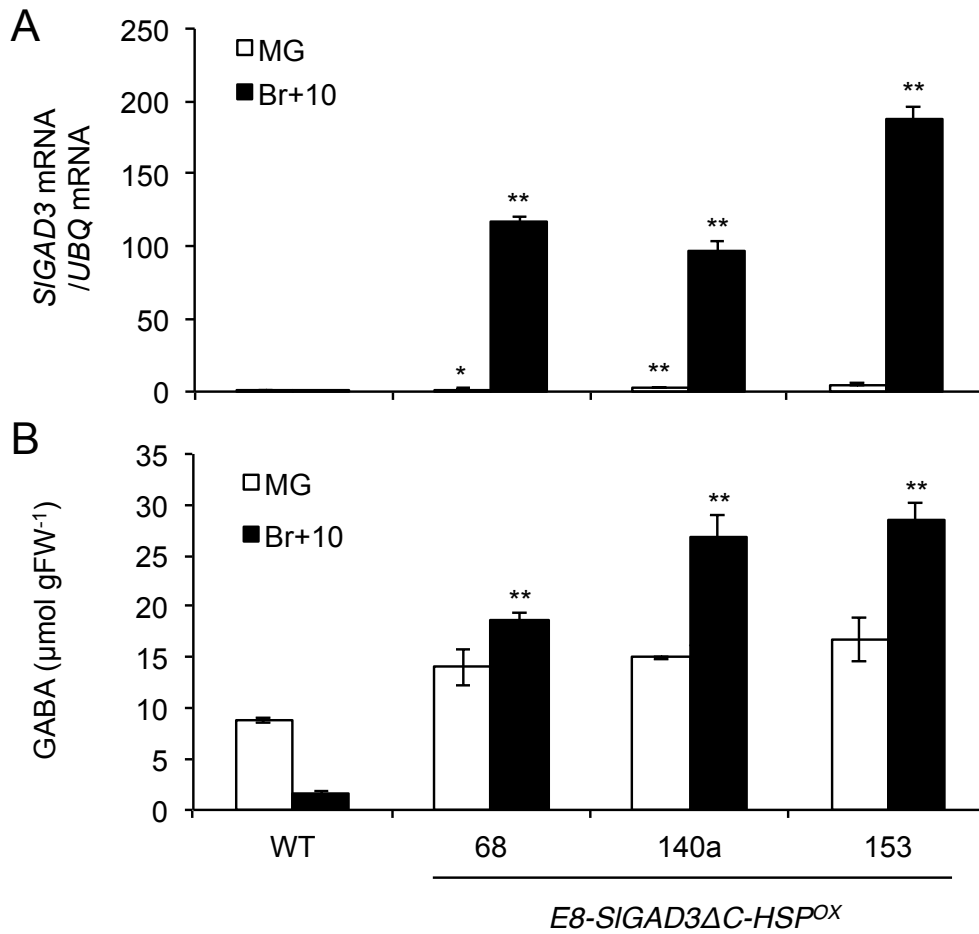
**Fig. 22** *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 ( $T_0$  世代) の Br+10 果実の着色

A. Br+10 果実の様子

B. Br+10 果実におけるリコペン含量

グラフの値は平均値±SE (n=3) を示す.

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ). FW, fresh weight; Br+10, ブレーカー後 10 日目.



**Fig. 23** *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 ( $T_1$  世代) の MG および Br+10 果実における *SIGAD3* 遺伝子の発現解析と GABA 含量の定量

A. Br+10 果実における *SIGAD3* の相対発現量 (qRT-PCR)

B. Br+10 果実における GABA 含量

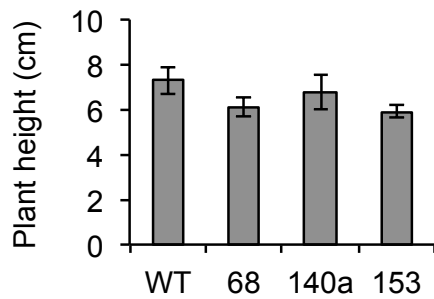
qRT-PCR は *SIUbiquitin3* を内部標準に用いた。グラフの値は平均値 $\pm$ SE (n=3) を示す。アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01)。FW, fresh weight; MG, 緑熟期; Br+10, ブレーカー後 10 日目。

A

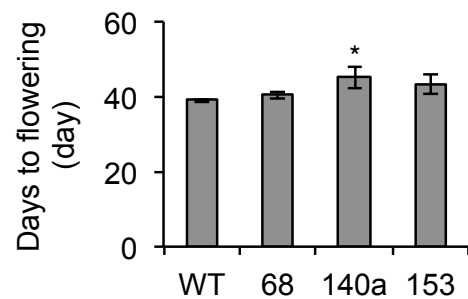
*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*



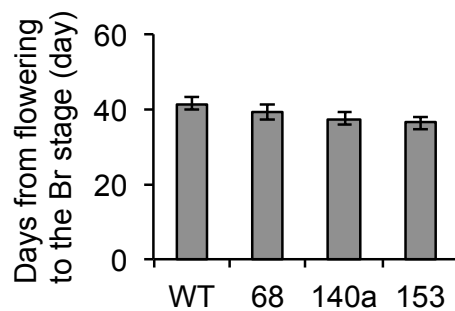
B



C



D



E

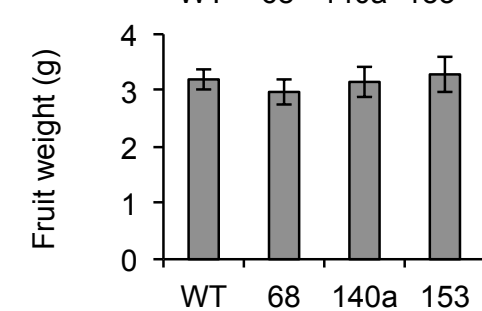


Fig. 24 *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の生育調査

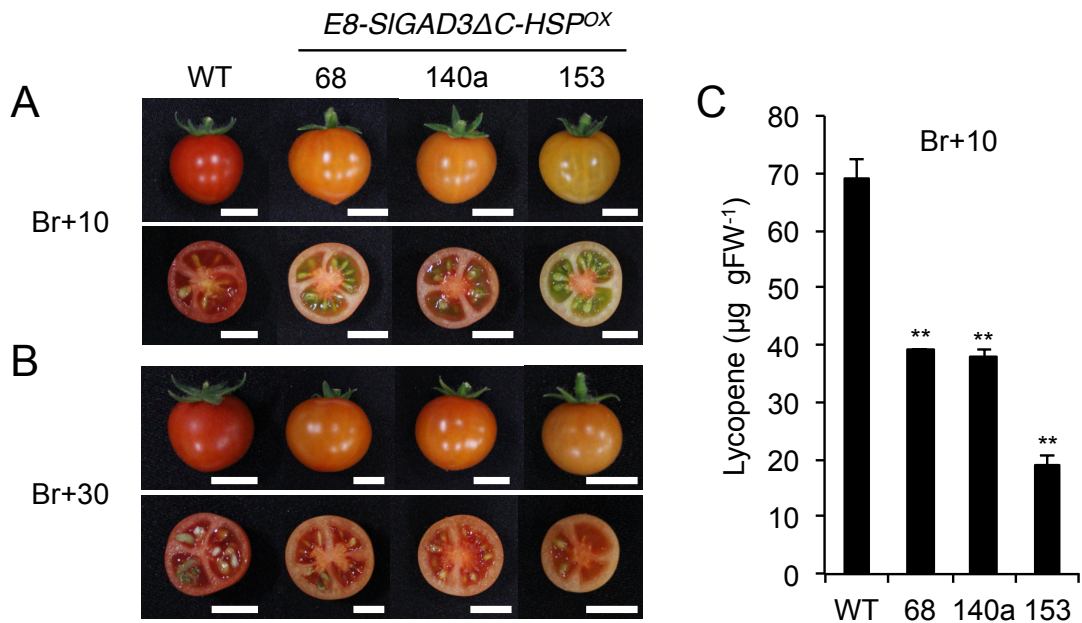
- A. 播種後3ヶ月の植物体の様子. Bar=5 cm
- B. 第一花開花時の草丈
- C. 到花日数
- D. 開花から Br ステージまでに要した日数
- E. 果実重

(B) グラフの値は平均値±SE (n=5) を示す.

(C-E) グラフの値は平均値±SE (n=13) を示す.

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01). Br, ブレーカー.





**Fig. 25** *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の果実着色

A. Br+10 果実の様子

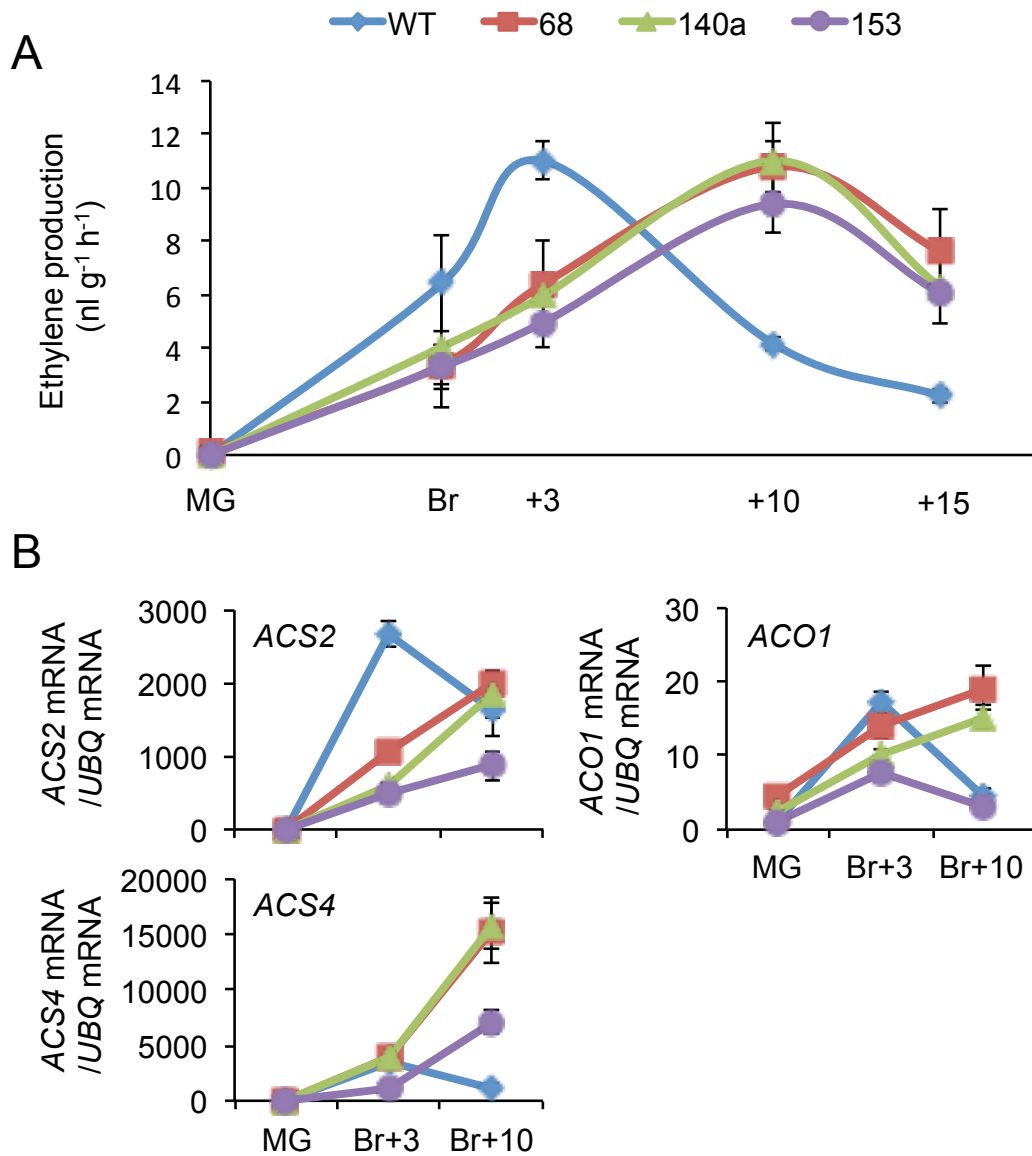
B. Br+30 果実の様子

C. Br+10 果実におけるリコペン含量

グラフの値は平均値±SE (n=3) を示す。

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01)。

FW, fresh weight; Br+10 (30), ブレーカー後 10 (30) 日目。



**Fig. 26** *E8-SIGAD3AC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の果実におけるエチレン生産量

A. 果実におけるエチレン生産量の推移

B. 果実におけるエチレン生合成遺伝子 (*ACS2*, *ACS4*, *ACO1*) の相対発現量 (qRT-PCR) グラフの値は平均値±SE (n=3) を示す.

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01). Br, ブレーカー.

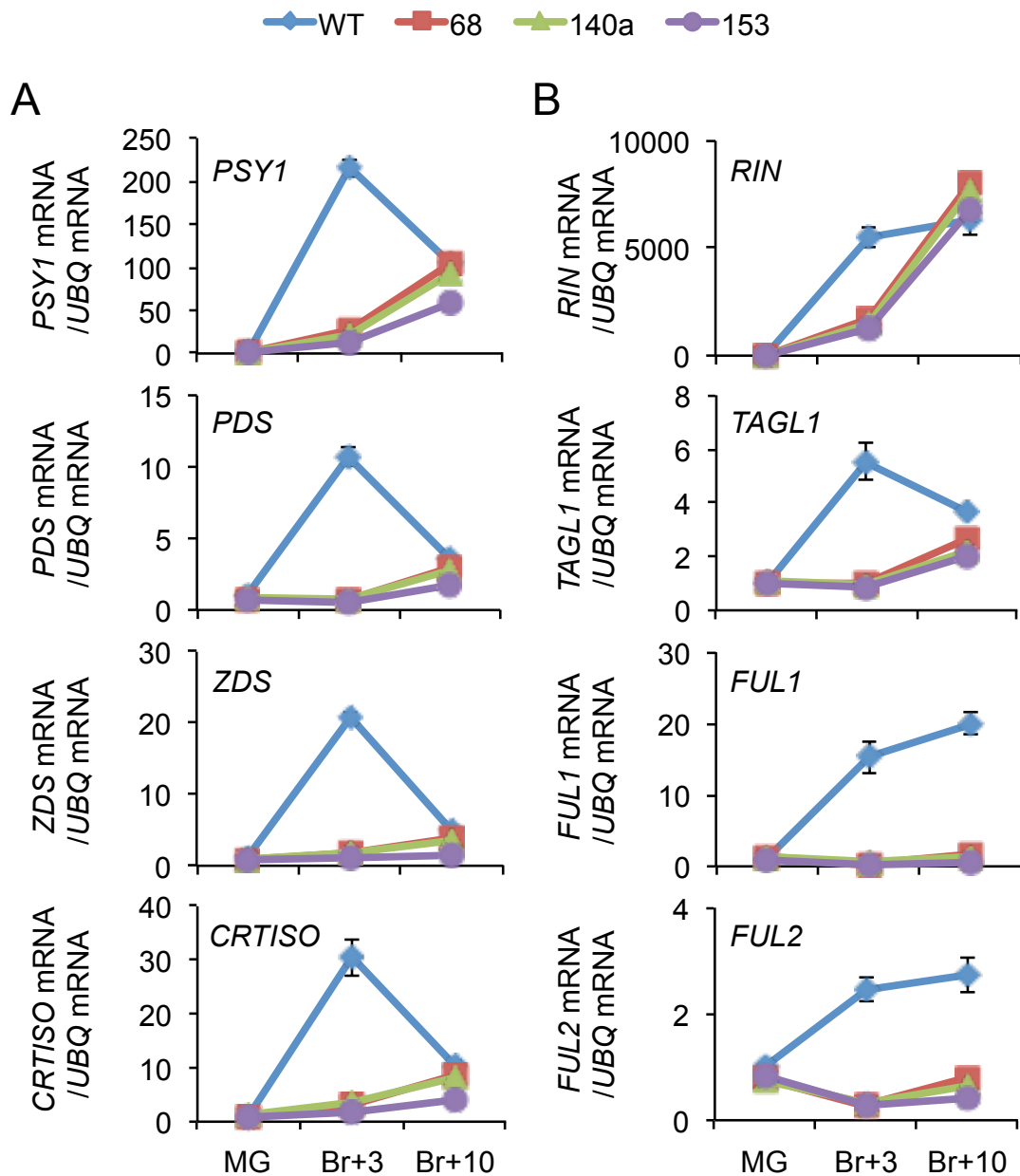


Fig. 27 *E8-SIGAD3AC-HSP<sup>OX</sup>* 系統 (T<sub>1</sub> 世代) の果実におけるカロテノイド生合成遺伝子の発現解析

- A. 果実におけるカロテノイド生合成遺伝子 (*PSY1*, *PDS*, *ZDS*, *CRTISO*) の相対発現量 (qRT-PCR)
- B. 果実における成熟関連転写因子 (*RIN*, *TAGL1*, *FUL1*, *FUL2*) の相対発現量 (qRT-PCR)

グラフの値は平均値±SE (n=3) を示す。

アスタリスクは WT と組換え系統間で Student's *t* 検定による有意差があることを示す (\**P*<0.05, \*\**P*<0.01). Br, ブレーカー。

## 総合考察

本研究では、トマト果実における GABA の生合成ステップに着目し、その分子制御機構を解明することで GABA 高含有トマトの作出を試みた。まず第 1 章では、トマト果実内で GABA 生合成への関与が見込まれる 3 つの *GAD* 遺伝子 (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) について発現抑制形質転換体を作製し、果実内 GABA 含量に及ぼす影響を調査した。その結果、3 つの *SIGAD* 遺伝子の発現を同時に抑制した *RNAi-SIGADall* 系統では、緑熟果実および赤熟果実において GABA 含量の著しい減少 (WT の 1/10 以下) がみられた (Fig. 8)。このことから、トマト果実に蓄積される GABA の大部分 (90%以上) は GAD を介したグルタミン酸の脱炭酸反応によって生産されていることが示唆された。また、果実内 GABA 含量の減少傾向は *SIGAD2* あるいは *SIGAD3* の発現を特異的に抑制した形質転換体 (*RNAi-SIGAD2*, *RNAi-SIGAD3* 系統) においても確認された (Fig. 6, 7)。特に *RNAi-SIGAD3* 系統に関しては、*RNAi-SIGADall* 系統と同様、緑熟果実および赤熟果実において著しい GABA 含量の減少 (WT の 1/10 以下) がみられた (Fig. 7)。一方、*RNAi-SIGAD2* 系統に関しては、WT と比較して果実内 GABA 含量が有意に減少していたものの、その減少率は *RNAi-SIGAD3* 系統と比較すると小さかった (Fig. 6, 7)。このことから、通常の栽培条件において、*SIGAD2* および *SIGAD3* はいずれも GABA の生合成に関与しているものの、*SIGAD2* は *SIGAD3* と比較して活性が低い可能性が考えられた。しかしながら、本研究で作出した *RNAi-SIGAD2* における *SIGAD2* mRNA レベルは *RNAi-SIGAD3* における *SIGAD3* mRNA レベルと比較すると抑制度合いがやや弱く、単純に *SIGAD2* の機能欠失が不完全であった可能性も除外できない。従って、トマト果実内の GABA 生合成における *SIGAD2* および *SIGAD3* のより詳細な寄与率を明らかにするためには、各遺伝子の変異体を複数系統スクリーニングし、機能が完全に欠損している系統同士で比較を行う、もしくは大腸菌発現系等を利用して各酵素を発現させ、比活性を算出するなどのアプローチが有効と考えられる。

第 1 章の結果から *SIGAD2* と *SIGAD3* のどちらがより GABA の生合成に寄与しているかを結論づけることはできなかった。しかしながら、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。Akihiro ら (2008) によってトマト果実から 3 つの *SIGAD* 遺伝子 (*SIGAD1*, *SIGAD2*, *SIGAD3*) が単離される以前にも、他の研究グループによってトマトから GAD をコードする遺伝子 (*ERT D1*, *GAD-19*) が単離されている (Gallego et al. 1995; Kisaka et al. 2006)。このうち、*ERT D1* は *SIGAD1* とアミノ酸配列が 100%一致することから、*SIGAD1* のアレルと考えられている

る (Akihiro et al. 2008) . 一方, *GAD-19* は *SIGAD2* および *SIGAD3* のいずれのアミノ酸配列とも完全には一致しないが, blast データベース検索では, *SIGAD2* が最も相同性の高い遺伝子として出力される (アミノ酸配列で 95%一致) . この *GAD-19* 遺伝子に関しては, アンチセンス法により機能欠失実験が行われ, GAD mRNA レベルが抑制された系統において果実内 GABA 含量が調査された結果, WT と比較して有意差は検出されなかった (Kisaka et al. 2006) . 従って, GABA 蓄積に大きく影響する GAD 遺伝子 (*SIGAD3*) をトマト果実において初めて特定したという点で, 本研究は 1 つの有用な知見を提供できたと考える. また, 35S プロモーター及び NOS ターミネーターを用いた *SIGAD3* の過剰発現体 (35S-*SIGAD3*-NOS<sup>OX</sup>) では, 緑熟果実で WT の約 3 倍, 赤熟果実では WT の 4 倍以上の GABA 蓄積がみられたことから (Fig. 12) , *SIGAD3* は GABA 高含有トマトの作出に応用可能な有用遺伝子であることが示された.

そこで第 1 章で得られた知見を活かして, 第 3 章ではさらなる GABA の高蓄積化を目指した. 先行研究において, *SIGABA-T* の RNAi により GABA 高含有トマトの作出が試みられた際には, *SIGABA-T1* の発現抑制と GABA 含量の増加傾向に強い相関がみられ, 最も蓄積量の多かった系統では赤熟果実において 14  $\mu\text{mol/gFW}$  の GABA が蓄積された (Koike et al. 2013) . このことから *SIGABA-T1* 遺伝子の発現がトマト果実内の GABA 代謝において最も重要なアイソフォームであることが示唆された. しかしながら, *SIGABA-T1* の RNAi 系統では *SIGABA-T1* の発現抑制に伴って結実率の著しい低下も観察され, 発現抑制度合いが強い (すなわち GABA の高蓄積が期待できる) 系統ほど, 果実が実らない可能性があった. この不良形質の発生を克服するために, 先行研究では果実特異的発現を誘導する E8 プロモーターを用いた RNAi 形質転換体の作出も試みられた. それらの系統では不稔形質は回避されたものの, 35S プロモーターを用いた形質転換体ほど赤熟果実において GABA 含量の増加はみられなかった (Koike et al. 2013) . そこで本研究では, *SIGAD3* の過剰発現による GABA の更なる高蓄積化を試みる際に, E8 プロモーターと共に外来遺伝子の高発現化に有効な HSP ターミネーターを組み合わせることで, 果実特異的に *SIGAD3* の発現を高められないかと考えた. また, 他の植物種において GAD の酵素活性は C 末の 30-50 アミノ酸残基を切除することで上昇することが報告されているため (Baum et al. 1996; Akama and Takaiwa 2007) , 本研究では正常な *SIGAD3* あるいは C 末を切除した *SIGAD3* (*SIGAD3 $\Delta$ C*) を E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットを用いて過剰発現させ, 果実内 GABA 含量への影響を調査した.

その結果, *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* および *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実において *SIGAD3* ( $\Delta C$ ) 発現量の著しい増加がみられ (WT の 300 倍以上; Fig. 21A) , その増加量は第 1 章で作出した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* (赤熟果実において WT の 200-280 倍; Fig. 12C) を上回る結果となった. このことから, E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットは赤熟期のトマト果実における *SIGAD3* の高発現化に有効であることが明らかとなった. また, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実における *SIGAD3* ( $\Delta C$ ) 発現量は *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* とほぼ同程度であったにもかかわらず, GABA 含量は *E8-SIGAD3-HSP<sup>OX</sup>* よりも 1.9 倍高い結果となった (Fig. 21) . このことから, *SIGAD3* の C 末伸長領域は他の植物種と同様, 自己阻害ドメインとしての機能を有し, そのドメインを切除することで GABA の生合成活性が増加することが示唆された.

また, *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の Br+10 果実における GABA 含量は最高で  $29 \mu\text{mol gFW}^{-1}$  ( $295 \text{ mg } 100 \text{ gFW}^{-1}$ ) に達し, この値は第 1 章で作出した *35S-SIGAD3-NOS<sup>OX</sup>* ( $13-17 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ ; Fig. 12D) や先行研究で作出された *SIGABA-T1 RNAi* 個体 ( $14 \mu\text{mol gFW}^{-1}$ ; Koike et al. 2013) , さらに GABA を高蓄積することが知られる野生種トマトの *S. pennellii* (栽培品種の 4-5 倍; 約  $200 \text{ mg } 100 \text{ gFW}^{-1}$ ) と比較しても上回る結果となった (Schauer et al. 2005) . これらの結果から, 第 3 章で検討した E8 プロモーター/HSP ターミネーター発現カセットと *SIGAD3* の C 末切除を組み合わせる手法は, トマト果実内の GABA 蓄積を飛躍的に高めるのに有効であることが示唆された.

現在, 世界で 10 億人以上が高血圧を発症していると推測されており, その予防の必要性が増している. 1 日  $10-20 \text{ mg}$  の GABA を摂取することにより, 高血圧症の予防と進展阻害効果, 軽症高血圧者における血圧降下作用が認められている (Fukuwatari et al. 2001; Kazami et al. 2002; Inoue et al. 2003) . この量を *E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実に換算すると,  $3.4-6.8 \text{ gFW}$  ('Micro-Tom' バックグラウンドで 1-3 果実分) 分に相当し, これは 1 日に摂取できる現実的な量であると考えられた. 従って, 本研究では人の健康に寄与し得る十分量の GABA を蓄積するトマトが作出できたと考えられる. トマト果実における GABA の高蓄積化はトマト生産の観点からみてもメリットがあると考えられる. 近年, 生産者の所得向上と安定化を図るため, 高付加価値野菜の生産が増加しており, トマトにおいても高糖度トマトや高リコピントマトなどが市場に多く流通するようになった. 血圧管理を余儀なくされている患者が多さから, 抗血圧上昇作用を有する GABA を高蓄積させたトマトはある程度のニーズが見込まれる. 従って, 本研究ではト

マトの高付加価値化につながる有用な知見を提供することができたと考えられる。

本研究では、トマト果実における GABA 生合成制御機構の一端を解明することで、当初の目標であった GABA 高含有トマトを作出することができた。しかしながら、もう一つの課題であったトマト果実における GABA の生理機能については十分に解明することができなかった。様々な品種のトマト果実において、GABA は開花直後から緑熟期にかけて高蓄積するものの、ブレイカーステージを境に急激に分解されることが確認されている (Rolin et al. 2000; Carrari et al. 2006; Akihiro et al. 2008)。このことから、トマト果実発達において GABA の代謝は何らかの生理的意義を有するものと予想された。

トマト果実における GABA 蓄積の役割として、これまでにいくつかの仮説が提案されている。1つ目は細胞内 pH の制御である (Rolin et al. 2000)。トマト果実の発達初期には、葉から転流されたスクロースをもとに有機酸が継続的に合成され、それと同時に多くの  $H^+$  が生産される。 $H^+$  の過剰蓄積は細胞内の酸性化を引き起こす原因となり得るが、ATP 駆動型  $H^+$  ポンプによる細胞外への  $H^+$  の排出、あるいは有機酸の脱炭酸反応による  $H^+$  の消費によって細胞内の  $H^+$  レベルは制御されると考えられている。GAD による GABA の生合成も  $H^+$  を消費する反応であることから、GAD 反応は過剰な  $H^+$  のシンクとして働き、細胞内の酸性化を防ぐ働きをしている可能性が示唆されている (Rolin et al. 2000)。また、2つ目の仮説としてグルタミン酸輸送の促進効果が挙げられる (Rolin et al. 2000)。トマトにおいてグルタミン酸は篩管を移動する主要な窒素形態であり、果実にも輸送されると考えられている (Valle et al. 1998)。果実に到達したグルタミン酸はシンプラスト経路、あるいはプロトン共輸送メカニズムを介してさらに隣接細胞へと輸送される。後者の輸送メカニズムの場合、グルタミン酸と同時に  $H^+$  が細胞質に取り込まれるため、細胞質のアシドーシスや細胞膜の脱分極が生じやすくなる。そのため、果実発達過程で誘導される GAD 活性は、細胞質の過剰な  $H^+$  を消費することで持続的なグルタミン酸輸送を可能にし、その結果として GABA 蓄積の増加が生じている可能性がある (Snedden et al. 1992; Rolin et al. 2000)。また、3つ目の仮説としてエネルギー生産への寄与が示唆されている。先行研究において  $1-[^{14}C]-GABA$  を用いたトレーサー実験が行われ、トマト果実内で分解された GABA が TCA 回路に流入していることが明らかにされた (Yin et al. 2010)。さらに、トマトの葉では TCA 回路関連酵素の機能が欠失すると、呼吸基質であるコハク酸を生産する代替経路として GABA シヤントが活性化す



ることが報告されている (Stuart-Guimarães et al. 2007) . これらの知見から、果実発達前期に蓄積される GABA は成熟に伴い分解され、一部はエネルギー生産の基質として利用され、残りは TCA 回路に流入し他の生体物質 (アミノ酸等) を生合成するための炭素源として利用されるのではないかと推察される. しかしながら、本論文の第 1 章で作出した *RNAi-SIGADall* 系統では、果実内の GAD 活性や GABA 蓄積が著しく抑制されたにも関わらず、植物体や果実の形態、発達に大きな異常はみられなかった. また、第 2 章で行った *RNAi-SIGADall* 系統のメタボローム解析では、トマト果実内の GABA 蓄積が大幅に減少しても他の一次代謝産物の含量にはほとんど影響がみられないことが明らかになった. これらの結果から、通常の栽培条件において GABA の生合成および GABA 蓄積がトマト果実の発達に及ぼす影響は非常に小さいことが示唆される. それでは、何故トマトは果実発達過程で GABA を高蓄積し、成熟とともに分解するのか.

考えられる可能性の 1 つとして、ストレス耐性への関与が挙げられる. トマト植物体において *SIGAD* 遺伝子あるいは *SIGABA-T* 遺伝子の発現を抑制すると塩ストレスに対する感受性が高まり、反対に、*SISSADH* 遺伝子の発現を抑制すると塩ストレスに対する感受性が低下することが報告されている (Bao et al. 2014) . このことから、トマトの植物体において、GABA 代謝は塩ストレス耐性に関与していると考えられる. また、灰色カビ病に耐性を有するトマト変異体 *sitiens* の葉では、GABA シヤント関連遺伝子の発現量が増加していること、外生 GABA を添加した WT の葉は灰色カビ病に対する感受性が低下することが明らかにされていることから、GABA シヤントは灰色カビ病に対する抵抗性にも関与していると推察される (Seifi et al. 2013) . トマト果実においても塩ストレス処理や収穫後の CO<sub>2</sub> 処理あるいは低酸素処理によって果実内の GABA 蓄積が増加することが明らかにされている (Deewatthanawong et al. 2010; Yin et al. 2010; Mae et al. 2012) . このことから、GABA を高蓄積する器官である果実においても、GABA の代謝はストレス耐性に関与している可能性が考えられる. また、植物において GABA は食害防御に効果があることが示唆されている (Bown et al. 2006) . 果実発達過程で GABA が高蓄積される時期は種子胚が発達する時期とほぼ一致しており、一方、種子が発芽能力を持ち始める緑熟期を過ぎると、GABA の蓄積は減少する. このことから、果実発達前期に蓄積される GABA は、未熟種子を食害から守る役割を果たしている可能性が考えられる. また、本論文の第 3 章で作出した C 末を切除した *SIGAD3* の過剰発現体 (*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*) では、GABA の高蓄積化に伴い果皮の色が薄くなる形質がみら

れた。通常、WT の果実では Br+7 ステージには赤熟に達するが、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実は、Br+10 ステージにおいても完全には赤くはならなかった (Fig. 25) 。この果実着色の異常はリコペン含量の低下や果実成熟期のエチレン生産量の増加の遅れ、さらにカロテノイド合成遺伝子や果実成熟に関わる転写因子の発現抑制を伴っていた (Figs 25, 26, 27) 。これらの結果から、トマト果実において GABA の蓄積は、何らかの形で果実成熟の制御に影響を及ぼすと考えられる。果実発達過程を通して GABA 蓄積が抑えられる *RNAi-SIGADall* 系統においては、果実成熟プロセスに異常はみられなかった (Fig. 14) 。このことから、WT の果実発達前期にみられる GABA 蓄積は果実成熟の制御にはほとんど影響していないと考えられる。しかし、成熟期の果実において GAD 活性の急激な低下がみられること (Akihiro et al. 2008) 、成熟期に GABA を過剰蓄積させると果実成熟プロセスに異常が生じること (*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>*) を考慮すると、正常な果実成熟には成熟期に GABA が過剰に存在しないことが重要な条件なのではないかと推察される。つまり、成熟期において GABA の過剰蓄積は成熟プロセスのブレーキとなる可能性がある。本研究では、その詳細なメカニズムを解明することはできなかったものの、*E8-SIGAD3ΔC-HSP<sup>OX</sup>* の果実では果実成熟の制御に関わる複数の転写因子の発現が抑制されていることが分かった。その中でも、エチレン依存的、非依存的な果実成熟プロセスの制御において、最も上流で働く転写因子として知られる *RIN* の発現にまで影響がみられたことは興味深い。

今後、本研究で作出した異なる GABA 蓄積を有する組換えトマトを有効に活用することで、前述した仮説を含め、トマト果実における GABA の機能が解明されることを期待する。

## 摘要

$\gamma$ -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。

以上の結果より、GABA の生合成を制御する主な鍵遺伝子が *SIGAD3* であることが明らかとなるとともに、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ない高 GABA 蓄積トマトの開発が可能であることが実証された。加えて、GABA が果実の成熟制御について重要な役割をしていることが示唆された。

## 謝辞

本研究の遂行および本論文のとりまとめにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました筑波大学生命環境系教授 江面浩博士に心から深謝致します。また、本研究の推進ならびに本論文の作成において多大なるご支援、ご指導を賜りました同大学同系教授 松倉千昭博士ならびに同大学同系准教授 有泉亨博士に心より感謝申し上げます。さらに、本論文の作成にあたり、ご高閲の労を賜りました同大学同系教授 菅谷純子博士ならびに同大学同系准教授 三浦謙治博士に厚く御礼申し上げます。

本研究のメタボローム解析においてご支援下さいました理化学研究所環境資源科学センター 斉藤和季博士ならびに同研究所同センター 草野都博士にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり実験技術の面でご助言を賜りました島根大学生物資源科学部教授 赤間一仁博士に心より御礼申し上げます。

最後になりますが、本研究を遂行するにあたり、多大なるご助言、ご助力、激励のお言葉を戴きました蔬菜花卉研究室の皆様深く御礼申し上げます。

## 引用文献

**Abdou AM, Hisashiguchi S, Horie K, Kim M, Hatta H, Yokogoshi H** (2006) Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors* **26**: 201-208

**Akama K, Akihiro T, Kitagawa M, Takaiwa F** (2001) Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochim Biophys Acta* **1522**: 143-150

**Akama K, Takaiwa F** (2007) C-terminal extension of rice glutamate decarboxylase (OsGAD2) functions as an autoinhibitory domain and overexpression of a truncated mutant results in the accumulation of extremely high levels of GABA in plant cells. *J Exp Bot* **58**: 2699-2707

**Akama K, Kanetou J, Shimosaki S, Kawakami K, Tsuchikura S, Takaiwa F** (2009) Seed-specific expression of truncated OsGAD2 produces GABA-enriched rice grains that influence a decrease in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Transgenic Res* **18**: 865-876

**Akbarian S, Huang HS** (2006) Molecular and cellular mechanisms of altered *GAD1/GAD67* expression in schizophrenia and related disorders. *Brain Res Rev* **52**: 293-304

**Akihiro T, Koike S, Tani R, Tominaga T, Watanabe S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Matsukura C, Akama K, Fujimura T, Ezura H** (2008) Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant Cell Physiol* **49**: 1378-1389

**Alba R, Payton P, Fei Z, McQuinn R, Debbie P, Martin GB, Tanksley SD, Giovannoni JJ** (2005) Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* **17**: 2954-2965

**Allan WL, Simpson JP, Clark SM, Shelp BJ** (2008)  $\gamma$ -Hydroxybutyrate accumulation in *Arabidopsis* and tobacco plants is a general response to abiotic stress: putative regulation by redox balance and glyoxylate reductase isoforms. *J Exp Bot* **59**: 2555-2564

**Bao H, Chen X, Lv S, Jiang P, Feng J, Fan P, Nie L, Li Y** (2014) Virus-induced gene silencing reveals control of reactive oxygen species accumulation and salt tolerance in tomato by  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolic pathway. *Plant Cell Environ* **38**: 600-613

**Baum G, Chen Y, Arazi T, Takatsuji H, Fromm H** (1993) A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *J Biol Chem* **268**: 19610-19617

**Baum G, Lev-Yadun S, Fridmann Y, Arazi T, Katsnelson H, Zik M, Fromm H** (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J* **15**: 2988-2996

**Bemer M, Karlova R, Ballester AR, Tikunov YM, Bovy AG, Wolters-Arts M, Rossetto Pde B, Angenent GC, de Maagd RA** (2012) The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *Plant Cell* **24**: 4437-4451

**Boggio SB, Palatnik JF, Heldt HW, Valle EM** (2000) Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Sci* **159**: 125-133

**Bouché N, Fait A, Bouchez D, Møller SG, Fromm H** (2003) Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proc Natl Acad of Sci U S A* **100**: 6843-6848

**Bouché N, Fromm H** (2004a) GABA in plants; Just a metabolite? *Trends Plant Sci* **9**: 110-115

**Bouché N, Fait A, Zik M, Fromm H** (2004b) The root-specific glutamate decarboxylase (GAD1) is essential for sustaining GABA levels in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **55**: 315-325

**Bown AW, MacGregor KB, Shelp BJ** (2006) Gamma-aminobutyrate: defense against invertebrate pests? *Trends Plant Sci* **11**: 424-427

**Bown AW, Shelp BJ** (1997) The metabolism and function of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol* **115**: 1-5

**Breitkreuz KE, Allan WL, Van Cauwenberghe OR, Jakobs C, Talibi D, Andre B, Shelp BJ** (2003) A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency. *J Biol Chem* **278**: 41552-41556

**Busch KB, Fromm H** (1999) Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiol* **121**: 589-597

**Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2006) Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol* **142**: 1380-1396.

**Carroll AD, Fox GG, Laurie S, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR** (1994) Ammonium assimilation and the role of  $\gamma$ -aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions. *Plant Physiol* **106**: 513-520

**Chomczynski P** (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* **201**: 134-139



**Clark SM, Di Leo R, Dhanoa PK, Van Cauwenberghe OR, Mullen RT, Shelp BJ** (2009a) Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an Arabidopsis gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *J Exp Bot* **60**: 1743-1757

**Clark SM, Di Leo R, Van Cauwenberghe OR, Mullen RT, Shelp BJ** (2009b) Subcellular localization and expression of multiple tomato gamma-aminobutyrate transaminases that utilize both pyruvate and glyoxylate. *J Exp Bot* **60**: 3255-3267

**Crawford LA, Bown AW, Breitzkreuz KE, Guinel FC** (1994) The synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol* **104**: 865-871

**Deewatthanawong R, Rowell P, Watkins CB** (2010)  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) metabolism in CO<sub>2</sub> treated tomatoes. *Postharvest Biol Technol* **57**: 97-105

**Fait A, Nunes-Nesi A, Angelovici R, Lehmann M, Pham PA, Song L, Haslam RP, Napier JA, Galili G, Fernie AR** (2011) Targeted enhancement of glutamate-to- $\gamma$ -aminobutyrate conversion in Arabidopsis seeds affects carbon-nitrogen balance and storage reserves in a development-dependent manner. *Plant Physiol* **157**: 1026-1042

**Forde BG and Lea PJ** (2007) Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J Exp Bot* **58**: 2339-2358

**Fujisawa M, Nakano T, Shima Y, Ito Y** (2013) A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS Box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *Plant Cell* **25**: 371-386

**Fujisawa M, Nakano T, Ito Y** (2011) Identification of potential target genes for the tomato

fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biol* **11**: 26

**Fujisawa M, Shima Y, Nakagawa H, Kitagawa M, Kimbara J, Nakano T, Kasumi T, Ito Y** (2014) Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS box proteins. *Plant Cell* **26**: 89-101

**Fukuwatari Y, Sato N, Kawamori R, Watanabe Y, Yoshida K, Ying R, Matsuda K, Fujii A, Uzawa M, Sato R** (2001) A study on the antihypertensive action and safety of tablets containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *Eastern Medicine (in Japanese)* **17**:1-7

**Gallego PP, Whotton L, Picton S, Grierson D, Gray JE** (1995) A role for glutamate decarboxylase during tomato ripening: the characterization of a cDNA encoding a putative glutamate decarboxylase with a calmodulin-binding site. *Plant Mol Biol* **27**: 1143-1151

**Gut H, Dominici P, Pilati S, Astegno A, Petoukhov MV, Svergun D., Grütter MG, Capitani G** (2009) A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase. *J Mol Biol* **392**: 334-351

**Hirai T, Kim YW, Kato K, Hiwasa-Tanase K, Ezura H** (2011a) Uniform accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomato fruit using a fruit-ripening-specific E8 promoter. *Transgenic Res* **20**: 1285-1292

**Hirai T, Kurokawa N, Duhita N, Hiwasa-Tanase K, Kato K, Kato K, Ezura H** (2011b) The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* induces a high level of miraculin accumulation in transgenic tomatoes. *J Agric Food Chem* **59**: 9942-9949

**Hoover GJ, Van Cauwenberghe OR, Breikreuz KE, Clark SM, Merrill AR, Shelp BJ** (2007) Characteristics of an *Arabidopsis* glyoxylate reductase: general biochemical properties and substrate specificity for the recombinant protein, and developmental expression and implications for glyoxylate and succinic semialdehyde metabolism in planta. *Can J Bot* **85**:

883-895

**Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, Sansawa H** (2003) Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing gamma-aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr* **57**: 490-495

**Itkin M, Seybold H, Breitel D, Rogachev I, Meir S, Aharoni A** (2009) TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J* **60**: 1081-1095

**Jannoey P, Niamsup H, Lumyong S, Tajima S, Nomura M, Chairote G** (2010)  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) accumulations in rice during germination. *Chiang Mai J Sci* **37**: 124-133

**Jakoby WD** (1962) Enzyme of  $\gamma$ -aminobutyrate metabolism (Bacterial). *Methods Enzymol* **5**: 765-778

**Kajimoto O, Hirata H, Nakagawa S, Kajimoto Y, Hayakawa K, Kimura M** (2004) Hypotensive effect of fermented milk containing  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in subjects with high normal blood pressure (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **51**: 79-86

**Kathiresan A, Miranda J, Chinnappa CC, Reid DM** (1998)  $\gamma$ -Aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. *Plant Growth Regul* **26**: 131-137

**Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM** (1997)  $\gamma$ -Aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. *Plant Physiol* **115**: 129-135

**Kazami D, Ogura N, Fukuchi T, Tsuji K, Anazawa M, Maeda H** (2002) Antihypertensive effect of Japanese taste seasoning containing  $\gamma$ -amino butyric acid on mildly hypertensive and high-normal blood pressure subjects and normal subjects (in Japanese). *Nippon Shokuhin*

Kagaku Kogaku Kaishi **49**: 409-415

**Kisaka H, Kida T, Miwa T** (2006) Antisense suppression of glutamate decarboxylase in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) results in accumulation of glutamate in transgenic tomato fruits. Plant Biotechnol **23**: 267-274

**Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM** (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell **3**: 1187-1193

**Koike S, Matsukura C, Takayama M, Asamizu E, Ezura H** (2013) Suppression of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transaminase induces prominent GABA accumulation, dwarfism and infertility in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant Cell Physiol **54**: 793-807

**Komatsuzaki N, Nakamura T, Kimura T, Shima J** (2008) Characterization of glutamate decarboxylase from a high  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. Biosci Biotechnol Biochem **72**:278-285

**Kurokawa N, Hirai T, Takayama M, Hiwasa-Tanase K, Ezura H** (2013) An E8 promoter-HSP terminator cassette promotes the high-level accumulation of recombinant protein predominantly in transgenic tomato fruits: a case study of miraculin. Plant Cell Rep **32**: 529-536

**Kusano M, Redestig H, Hirai T, Oikawa A, Matsuda F, Fukushima A, Arita M, Watanabe S, Yano M, Hiwasa-Tanase K, Ezura H, Saito K** (2011) Covering chemical diversity of genetically-modified tomatoes using metabolomics for objective substantial equivalence assessment. PLoS ONE **6**: e16989. doi:10.1371/journal.pone.0016989

**Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL** (1987) Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. Proc Natl Acad of Sci U S A **84**: 2793-2797

**Liu C, Zhao L, Yu G** (2011) The dominant glutamic acid metabolic flux to produce  $\gamma$ -amino butyric acid over proline in *Nicotiana tabacum* leaves under water stress relates to its significant role in antioxidant activity. *J Integr Plant Biol* **53**: 608-618

**Liu L, Shao Z, Zhang M, Wang Q** (2015) Regulation of carotenoid metabolism in tomato. *Mol Plant* **8**: 28-39

**Mae N, Makino Y, Oshita S, Kawagoe Y, Tanaka A, Aoki K, Kurabayashi A, Akihiro T, Akama K, Koike S, Takayama M, Matsukura C, Ezura H** (2012) Accumulation mechanism of  $\gamma$ -aminobutyric acid in tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) under low O<sub>2</sub> with and without CO<sub>2</sub>. *J Agric Food Chem* **60**: 1013-1019

**Matsumoto Y, Ohno K, Hiraoka Y** (1997) Studies on the utilization of functional food materials containing high levels of gamma-aminobutyric acid (Part1) (in Japanese). *Ehime Kougai Kenkyu Houkoku* **35**: 97-100

**Mazzucotelli E, Tartari A, Cattivelli L, Forlani G** (2006) Metabolism of  $\gamma$ -aminobutyric acid during cold acclimation and freezing and its relationship to frost tolerance in barley and wheat. *J Exp Bot* **57**: 3755-3766

**Miki D, Shimamoto K** (2004) Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol* **45**: 490-495

**Nagata M, Yamashita I** (1992) Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **39**: 925-928

**Nagaya S, Kawamura K, Shinmyo A, Kato K** (2010) The HSP terminator of *Arabidopsis thaliana* increases gene expression in plant cells. *Plant Cell Physiol* **51**: 328-332

**Nambeesan S, Datsenka T, Ferruzzi MG, Malladi A, Mattoo AK, Handa AK** (2010) Overexpression of yeast spermidine synthase impacts ripening, senescence and decay symptoms in tomato. *Plant J* **63**: 836-847

日本高血圧学会 (2014) 一般向け『高血圧治療ガイドライン』解説冊子「高血圧の話」. 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会, 認定 NPO 法人日本高血圧協会, NPO 法人ささえあい医療人権センターCOML 編, ライフサイエンス出版

**Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A** (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* **254**: 437-439

**Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Brès C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H** (2011) Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant Cell Physiol* **52**: 1994-2005

**Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, Onoda A, Kajimoto O, Takahashi R, Takahashi T** (2000) Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* (in Japanese) **47**: 596-603

**Owens DF, Kriegstein AR** (2002) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* **3**: 715-727

**Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D** (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* **114**: 47-59

**Renault H, El Amrani A, Palanivelu R, Updegraff EP, Yu A, Renou JP, Preuss D, Bouchereau A, Deleu C** (2011) GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis*

*thaliana*. Plant Cell Physiol **52**: 894-908

**Renault H, Roussel V, El Amrani A, Arzel M, Renault D, Bouchereau A, Deleu C** (2010) The *Arabidopsis pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. BMC Plant Biol **10**: 20. doi: 10.1186/1471-2229-10-20

**Renault H, El Amrani A, Palanivelu R, Updegraff EP, Yu A, Renou JP, Preuss D, Bouchereau A, Deleu C** (2011) GABA accumulation causes cell elongation defects and a decrease in expression of genes encoding secreted and cell wall-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol **52**: 894-908

**Rolin D, Baldet P, Just D, Chevalier C, Biran M, Raymond P** (2000) NMR study of low subcellular pH during the development of cherry tomato fruit. Aust J Plant Physiol **27**: 61-69

**Saikusa T, Horino T, Mori Y** (1994) Distribution of free amino acids in the rice kernel and kernel fractions and the effect of water soaking on the distribution. J Agric Food Chem **42**: 1122-1125

**Saito T, Fukuda N, Iikubo T, Inai S, Fujii T, Konishi C, Ezura H** (2008a) Effects of root-volume restriction and salinity on the fruit yield and quality of processing tomato. J Japanese Soc Hort Sci **77**: 165-172

**Saito T, Matsukura C, Sugiyama M, Watahiki A, Ohshima I, Iijima Y, Konishi C, Fujii T, Inai S, Fukuda N, Nishimura S, Ezura H** (2008b) Screening for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich tomato varieties. J Japanese Soc Hort Sci **77**: 242-250

**Satya-Narayan V, Nair PM** (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. Phytochem **29**: 367-375

**Schauer N, Zamir D, Fernie A** (2005) Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species

tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. J Exp Bot **56**: 297-307

**Seifi HS, Curvers K, De Vleeschauwer D, Delaere I, Aziz A, Höfte M** (2013) Concurrent overactivation of the cytosolic glutamine synthetase and the GABA shunt in the ABA-deficient sitiens mutant of tomato leads to resistance against *Botrytis cinerea*. New Phytol **199**: 490-504

**Shelp BJ, Bown AW, McLean MD** (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci **4**: 446-452

**Shimajiri Y, Oonishi T, Ozaki K, Kainou K, Akama K** (2013a) Genetic manipulation of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) shunt in rice: overexpression of truncated glutamate decarboxylase (*GAD2*) and knockdown of  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminase (*GABA-T*) lead to sustained and high levels of GABA accumulation in rice kernels. Plant Biotechnol J **11**: 594-604

**Shimajiri Y, Ozaki K, Kainou K, Akama K** (2013b) Differential subcellular localization, enzymatic properties and expression patterns of  $\gamma$ -aminobutyric acid transaminases (GABA-Ts) in rice (*Oryza sativa*). J Plant Physiol **170**: 196-201

**Shima Y, Kitagawa M, Fujisawa M, Nakano T, Kato H, Kimbara J, Kasumi T, Ito Y** (2013) Tomato FRUITFULL homologues act in fruit ripening via forming MADS-box transcription factor complexes with RIN. Plant Mol Biol **82**: 427-438

**Shi SQ, Shi Z, Jiang ZP, Qi LW, Sun XM, Li CX, Liu JF, Xiao WF, Zhang SG** (2010) Effects of exogenous GABA on gene expression of *Caragana intermedia* roots under NaCl stress: regulatory roles for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ethylene production. Plant Cell Environ **33**: 149-162

**Simpson JP, Di Leo R, Dhanoa PK, Allan WL, Makhmoudova A, Clark SM, Hoover GJ, Mullen RT, Shelp BJ** (2008) Identification and characterization of a plastid-localized *Arabidopsis* glyoxylate reductase isoform: comparison with a cytosolic isoform and



implications for cellular redox homeostasis and aldehyde detoxification. *J Exp Bot* **59**: 2545-2554

**Snedden WA, Chung I, Pauls RH, Bown AW** (1992) Proton/l-glutamate symport and the regulation of intracellular pH in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol* **99**: 665-671

**Snedden WA, Koutsia N, Baum G, Fromm H** (1996) Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *J Biol Chem* **271**: 4148-4153

**Snowden CJ, Thomas B, Baxter CJ, Smith JA, Sweetlove LJ** (2015) A tonoplast Glu/Asp/GABA exchanger that affects tomato fruit amino acid composition. *Plant J* **81**: 651-660

**Sorrequieta A, Ferraro G, Boggio SB, Valle EM** (2010) Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino Acids* **38**: 1523-1532

**Studart-Guimarães C, Fait A, Nunes-Nesi A, Carrari F, Usadel B, Fernie AR** (2007) Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the  $\gamma$ -aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. *Plant Physiol* **145**: 626-639

**Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H** (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426-431

**Trobacher CP, Zarei A, Liu J, Clark SM, Bozzo GG, Shelp BJ** (2013) Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit. *BMC Plant Biol* **13**: 144. doi: 10.1186/1471-2229-13-144

**Tsuchida T, Mashiko K, Yamada K, Hiratsuka H, Shimada T, Itagaki Y, Fujinuma H, Samejima K, Nakamura T, Hasegawa T, Matsubayashi T** (2003) Clinical study of

$\gamma$ -aminobutyric acid-rich *Chlorella* for subjects with high-normal blood and mild hypertension (in Japanese). J Jpn Soc Nutri Food Sci **56**: 97–102

**Tsushida T, Murai T, Omori M, Okamoto J** (1987) Production of a new type tea containing a high level of  $\gamma$ -aminobutyric acid (in Japanese). Nippon Nogeikagaku Kaishi **7**: 817-822

**Valle EM, Boggio SB, Heldt HW** (1998) Free amino acid composition of phloem sap and growing fruit of *Lycopersicon esculentum*. Plant Cell Physiol **39**: 458-461

**Van Cauwenberghe OR, Shelp BJ** (1999) Biochemical characterization of partially purified gaba:pyruvate transaminase from *Nicotiana tabacum*. Phytochem **52**: 575-581

**Van de Poel B, Bulens I, Markoula A, Hertog ML, Dreesen R, Wirtz M, Vandoninck S, Oppermann Y, Keulemans J, Hell R, Waelkens E, De Proft MP, Sauter M, Nicolai BM, Geeraerd AH** (2012) Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. Plant Physiol **160**: 1498-1514

**Wilkinson JQ, Lanahan MB, Clark DG, Bleecker AB, Chang C, Meyerowitz EM, Klee HJ** (1997) A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. Nat Biotechnol **15**: 444-447

**Yap KL, Yuan T, Mal TK, Vogel HJ, Ikura M** (2003) Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin. J Mol Biol **328**: 193-204

**Yin YG, Tominaga T, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Ashihara H, Nishimura S, Ezura H, Matsukura C** (2010) Metabolic Alterations in organic acids and  $\gamma$ -aminobutyric acid in developing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits. Plant Cell Physiol **51**: 1300-1314

**Yoshimura M, Toyoshi T, Sano A, Izumi T, Fujii T, Konishi C, Inai S, Matsukura C, Fukuda N, Ezura H, Obata A** (2010) Antihypertensive effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* **58**: 615-619

**Yu GH, Zou J, Feng J, Peng XB, Wu JY, Wu YL, Palanivelu R, Sun MX** (2014) Exogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *J Exp Bot* **65**: 3235-3248

**Zhou J, Zhang L, Li X, Chang Y, Gu Q, Lu X, Zhu Z, Xu G** (2012) Metabolic profiling of transgenic rice progeny using gas chromatography-mass spectrometry: the effects of gene insertion, tissue culture and breeding. *Metabolomics* **8**: 529-539