

総摘要

本研究は、トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) より、糖代謝系の重要な酵素である酸性インベルターゼをコードする遺伝子 (cDNA) を単離し、発現様式等について解析すると共に、同酵素のトマト植物体における生理的機能を Reverse genetics の手法により解明することを試みたものである。

果実における糖蓄積パターンの異なる2種、トマトおよび近縁野生種 *Lycopersicon peruvianum* を材料として、酸性インベルターゼアイソザイムの活性と糖含量の変動について調査した。その結果、果実および葉の糖組成 (還元糖量) と可溶性酸性インベルターゼ活性との間に密接な関連があることが示唆された。研究開始当初、*Lycopersicon* 属植物の酸性インベルターゼ遺伝子は未単離であったため、遺伝子単離に先だってトマト赤熟果実より可溶性酸性インベルターゼを精製し、N末端アミノ酸配列の決定を行った。

精製酵素のN末端配列を基に合成プライマー混合物を作製、PCRを行い、可溶性酸性インベルターゼをコードするcDNA、Aiv-1を単離した。得られたAiv-1 cDNAをプローブとして、2種トマト果実における遺伝子の発現状況を調査した。発育中のトマト果実におけるAiv-1 mRNA存在量の変動パターンは、活性の変動とほぼ一致し、果実成熟期 (開花後50~60日) に至り著しく増大した。一方、野生種果実では、分析した全てのステージの果実においてmRNAが検出されなかった。この結果は、2種の果実における可溶性酸性インベルターゼ活性の違いがmRNAレベルで制御されていることを示すものと考えられる。

可溶性酸性インベルターゼの詳細な生理的機能を推定するため、Aiv-1 cDNAを用いた Reverse genetics を実施した。Aiv-1 に対するアンチセンス遺伝子 (pBTI-2) を導入したトマトの赤熟果実における可溶性酸性インベルターゼ活性は、対照植物に比べ99%以上減少した。また、成熟葉においても同酵素活性の大幅な減少が認められた。対照植物と比較して、アンチセンス遺伝子導入個体の果実および成熟葉ではショ糖含量が増大し、還元糖量が減少していた。以上

の結果は、可溶性（液胞型）酸性インベルターゼが、果実等のシンク器官並びにソース器官（成熟葉）における糖組成の制御要因の1つであることを示唆している。加えて、アンチセンス遺伝子導入個体の植物体および果実の発育について対照植物との差異は認められないことから、果実成熟期に観察される高い可溶性酸性インベルターゼ活性の殆どは、果実の発育、シンク能の維持にとって必須ではないと考えられた。

既知酸性インベルターゼ間で保存性の高いアミノ酸配列を基に合成プライマー混合物を作製、PCRを行い、細胞壁結合型酸性インベルターゼに対するcDNA、*Wiv-1*を単離した。次いで、本研究で単離した2種の酸性インベルターゼ遺伝子、*Aiv-1*および*Wiv-1*の、傷害処理葉および植物体における発現状況について調査した。傷害処理による発現量の増大は、*Wiv-1* mRNAにおいてより顕著であり、また、*Aiv-1* mRNAのレベルは、傷害処理後48時間で最大値に達したが、*Wiv-1* mRNAは継続的に増大する傾向を示した。これらの結果は、2種の遺伝子が傷害に対してそれぞれ独立に反応することを示唆している。また、トマトの種々の器官における*Aiv-1*および*Wiv-1* mRNA存在量は、野生種の器官中の存在量よりも概して高く、これら mRNA存在量の種間差異は、それぞれの種の遺伝子の発現レベルの差異に起因するものと考えられた。

細胞壁結合型酸性インベルターゼの生理的機能を明らかにするため、単離したcDNA、*Wiv-1*に対するアンチセンス遺伝子（pBWI-2）を作製し、Reverse genetics実験を行った。得られた形質転換トマト9個体のうち3個体において、傷害処理葉中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の減少が認められた。これら3個体のソース葉中の炭水化物量は、対照よりも減少していた。この結果は、細胞壁結合型酸性インベルターゼが、ソース葉中の炭水化物量の変動に関わることを示唆している。また、多くの形質転換トマトにおいて、花粉稔性の低下や着果数の減少が認められた。この結果は、*Wiv-1* mRNAにコードされる細胞壁結合型酸性インベルターゼが、花器官形成期におけるシンク代謝にも関与することを示唆している。