

緒言

果実の多くは、成熟に伴い主としてショ糖を蓄積するが、トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill.) やブドウなど一部の果実は、ショ糖を殆ど含まず、ブドウ糖や果糖などの還元糖を主として蓄積する (Kliewer, 1966; Whittings, 1970)。 *Lycopersicon* 属植物の果実においては、糖蓄積パターンの違いが種間でも認められ、 *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium* 等の赤色系果実は、還元糖を主成分とするが、 *L. chmielewskii*, *L. hirsutum*, *L. peruvianum* 等の緑色系果実は、多量のショ糖を蓄積することが知られている (望月, 1987; Yelle et al., 1988; Miron and Schaffer, 1991; Stommel, 1992)。ショ糖蓄積型のトマト野生種は、育種上有用な高糖度形質を有する種として注目されてきた (Rick, 1974; Yelle et al., 1991)。また、 *Lycopersicon* 属果実における糖の代謝機構については、品質および生産性(収量)の向上という観点から今日まで精力的に植物生理学的、生化学的解析が進められてきた (Johnson et al., 1988; Robinson et al., 1988; Chetelat et al., 1993, 1995; Azanza et al., 1994, 1995; Hadas et al., 1995; Milner et al., 1995; Ho, 1996)。緑色系果実中に認められるショ糖蓄積形質は、ショ糖分解酵素の1つである可溶性酸性インベルターゼ (β -フルクトフラノシダーゼ; EC 3.2.1.26) の極めて低い活性によるものと推定されている (Manning and Maw, 1975; Yelle et al., 1988, 1991; 今田ら, 1990b; Miron and Schaffer, 1991; Stommel, 1992; Klann et al., 1993)。

インベルターゼは、ショ糖合成酵素と共に、植物体内、特にシンク器官におけるショ糖の可動化に携わる酵素である。多くの植物において、細胞内局在性、等電点、至適 pH の異なる複数のインベルターゼアイソザイムの存在が確認されている (Sturm and Chrispeels, 1990; Roitsch et al., 1995)。以下の表に各アイソザイムの特徴を示す。

表1 植物インベルターゼアイソザイムの特徴

種類	局在性	至適 pH	等電点
可溶性酸性 ¹	大部分が液胞中	酸性	酸性
細胞壁結合型 ²	細胞外 (細胞壁にイオン結合)	酸性	塩基性
中性 ³	細胞質	中性	未知
アルカリ性 ⁴	細胞質	弱塩基性	酸性 ⁵

1; Leigh et al. (1979), Giaquinta et al. (1983), Konno et al. (1993)

2; Strauss (1962), Hisajima and Arai (1978), Krishnan et al. (1985), Karuppiyah et al. (1989), Fahrendorf and Beck (1990)

3; Van den Ende and Van Laere (1995), Lee and Sturm (1996)

4; Chen and Black (1992), Ross et al. (1996), Lee and Sturm (1996)

5; Ross et al. (1996)

可溶性酸性インベルターゼは、シンク器官における転流糖（ショ糖）の利用、貯蔵糖の一形態としての還元糖への転換を促すものと考えられている（Leigh et al., 1979; Giaquinta et al., 1983; Yelle et al., 1991）。細胞壁結合型酸性インベルターゼは、師管からのショ糖の流入（unloading）（Miron and Schaffer, 1991; Dali et al., 1992; Ruan and Patrick, 1995; Ho, 1996; Brown et al., 1997）、シンク能（Weber et al., 1995, 1996; Cheng et al., 1996; Vizzotto et al., 1996）、重力屈性（Wu et al., 1993）等への関連が示唆されている。また、可溶性ならびに細胞壁結合型酸性インベルターゼは、傷害および病害に対する反応にも関与することが報告されている（Matsushita and Uritani, 1974; Sturm and Chrispeels, 1990; Benhamou et al., 1991; Ohyama et al., 1995, 1998; Herbers et al., 1996; Zhang et al., 1996）。一方、アルカリ性および中性インベルターゼは、細胞質における還元糖の代謝的要求に応じてショ糖分解に関わるものと考えられている（Ricardo, 1974; Masuda et al., 1988; Stommel and Simon, 1990; Lee and Sturm, 1996）。

トマト果実における酸性インベルターゼアイソザイムの機能に関する

生理生化学的研究は多数知られている。Ho and Baker (1982) 並びに Ho (1984) は、酸性インベルターゼあるいはショ糖合成酵素によるショ糖分解の程度が、シンク・ソース間のショ糖濃度勾配を制御し、同化産物のシンク器官への輸送率（シンク強度）を決定していると推測した。しかし、果実における可溶性酸性インベルターゼに関しては、前述の通り野生種果実中の活性が極めて低いことから、*Lycopersicon* 属の果実全般についてシンク強度の決定に関与するとは考えにくい。最近の研究では、むしろショ糖合成酵素について、果実生長初期の一過的澱粉蓄積 (Robinson et al., 1988; Klann et al., 1993; Wang et al., 1993, 1994) および果実の初期生長 (Sun et al., 199; シンク強度) との関連が示唆されている。一方、可溶性酸性インベルターゼは、ショ糖蓄積量の少ないメロン (non-sweet melon) 果実においても高い活性が認められていることから (Scaffer et al., 1987)、果実等の成熟組織における還元糖量の制御もしくはショ糖の再利用等に専ら関与する可能性が高い (Yelle et al., 1988, 1991)。

トマト果実中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、可溶性酵素の活性と比較して非常に低く (Johnson et al., 1988; 今田ら, 1990a; 大山ら, 1994; Ohyama et al., 1995)、その存在および機能については殆ど不明であったが、近年、各種阻害剤 (PCMBs 等) を用いた糖の取り込み試験により、エネルギー依存性のショ糖輸送 (unloading) 機構への関与が示唆されている (Dali et al., 1992; Ruan and Patrick, 1995; Ho, 1996; Ruan et al., 1996; Brown et al., 1997)。この仮説によれば、細胞壁結合型酸性インベルターゼによる細胞外におけるショ糖分解が、シンク器官におけるショ糖濃度勾配の維持、ならびに細胞膜に存在する H⁺/hexose transporter への還元糖の供給に貢献すると考えられる。

以上述べたように、シンク器官としてのトマト果実における酸性インベルターゼについては、その機能解明に向けて旺盛な研究が続けられてきており、かなりの知見が得られつつある。しかし、これらの研究より提唱された酸性インベルターゼの機能に関する仮説の大部分は、未だ検証されるには至っていない。また、酸性インベルターゼ活性は、光合成器官 (ソース器官) である成熟

葉においても存在し (Manning and Maw, 1975)、さらに、傷害あるいは病害により顕著な誘導を受ける (Matsushita and Uritani, 1974; Sturm and Chrispeels, 1990; Benhamou et al., 1991; Ohyama et al., 1995, 1998; Zhang et al., 1996)。これらの活性についての詳細な生理的意義は現在においても殆ど不明である。

一般に生理学的仮説の検証、さらには未知機能の解明のためには、遺伝子レベルからのアプローチ、いわゆる Reverse genetics 的手法による解析が非常に有効である。具体的には、対象とする遺伝子のアンチセンス鎖を発現できるベクター (アンチセンス遺伝子) を作製し、植物に導入することにより、内在遺伝子の発現を抑制し、植物体に生じた変化を解析することにより酵素機能を明らかにするものである。アンチセンス遺伝子導入は、植物体の特定の遺伝子発現を低下させることから、変異体作出法の一つとも考えられる。アンチセンス遺伝子の導入により内在遺伝子発現が抑制される機構は、現在においても完全に解明されてはいないが、転写されたアンチセンス鎖の mRNA が、内在遺伝子の転写、RNA のプロセッシング、翻訳過程等のいずれかに障害を起こすのではないかと推定されている (村上・岩瀬, 1996)。この Reverse genetics と呼ばれる手法は、植物生理学における仮説の最も確実な証明方法の一つである。糖代謝系の酵素では、UDP-グルコースピロフォスホリラーゼ (Zrenner et al., 1993; Spychalla et al., 1994)、ショ糖合成酵素 (Zrenner et al., 1995)、ADP-グルコースピロフォスホリラーゼ (Müller-Röber, 1992)、FBPase (Kossmann et al., 1994)、Sucrose transporter (Riesmeier et al., 1994) 等についてアンチセンス遺伝子による酵素活性の低下した植物が作製され、これら遺伝子の機能について解明が進められている。

本研究は、野菜の遺伝子組換え育種における有用遺伝子の単離、利用、さらには遺伝子産物の生理的機能の解明を目的とし、1989年より三重県安濃町の農林水産省 野菜・茶業試験場 野菜育種部において実施された。本論文は、トマト果実より、糖組成を制御すると考えられる可溶性酸性インベルターゼについて、その遺伝子 (cDNA) を単離し、構造、発現様式を明らかにするとともに

に、 Reverse genetics の手法を用いて可溶性酸性インベルターゼのトマト植物体内における機能を推定したものである。さらに、実験の進行に伴い、葉において、塩基配列の大きく異なる酸性インベルターゼアイソザイム（細胞壁結合型酸性インベルターゼ）遺伝子の存在が確認された。このアイソザイムについても遺伝子を単離し、発現レベル、機能解析等の調査を併せて実施した。