

## 第2章 可溶性酸性インベルターゼ遺伝子 (cDNA) の 単離、解析

### はじめに

植物の酸性インベルターゼ遺伝子は、最初にニンジンから単離された (Sturm and Chrispeels, 1990)。この遺伝子から推定されたアミノ酸配列中には、原核および真核生物のインベルターゼにおいて高度に保存された共通配列 (NDPNG:  $\beta$ -fructosidase motif) が存在する。本研究を開始した当初は、トマト果実酸性インベルターゼ遺伝子に関する情報は皆無であったことから、第1節においては、このインベルターゼ共通アミノ酸配列および前章第2節において決定した可溶性酸性インベルターゼのN末端配列を利用した遺伝子単離を試みた。第2節では、単離したcDNAを用い、トマトおよび野生種果実における遺伝子発現ならびに可溶性酸性インベルターゼ遺伝子のコピー数に関する解析を行った。

## 第1節 可溶性酸性インベルターゼ遺伝子 (cDNA) の単離と構造解析

一般に、蛋白の精製標品が得られている場合の遺伝子 (cDNA) 単離法は、発現 cDNA ライブラリーを作製し、抗体によりスクリーニングする方法 (Sturm and Chrispeels, 1990)、あるいは蛋白の部分アミノ酸配列から推定される塩基配列に対応する複数の DNA を化学的に合成し (合成オリゴヌクレオチド混合物)、これを直接プローブとして利用するスクリーニング法 (Elliott et al., 1993) に大別される。合成オリゴヌクレオチドの混合物を直接プローブとして用いる場合、プローブの重複度によっては偽クローンを多数単離する恐れがあり、これを避けるために、通常は複数の合成プローブを使用し、全てのプローブに対して陽性であったクローンを単離する方法が用いられる。しかし、複数のプローブを用いた場合においても偽クローンを単離する可能性が全く無いとは言い難い。本節では、前章、第2節において決定した成熟型可溶性酸性インベルターゼの N 末端アミノ酸配列およびインベルターゼ共通配列 (Sturm and Chrispeels, 1990;  $\beta$ -fructosidase motif) にそれぞれ対応する合成オリゴヌクレオチド混合物を作製し、これらをプライマーとした PCR により cDNA 断片を単離し、この断片をプローブとした cDNA クローンのスクリーニングを試みた。単離した cDNA については、その塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列レベルにおける、既知のインベルターゼとの構造比較等を行った。

### 2-1-1 材料および方法

#### 2-1-1-1 植物材料

温室で栽培した品種「ハウスおどりこ」の赤熟果実 (Red stage) を液体窒素中で磨碎し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存したものを材料とした。

### 2-1-1-2 RNAの抽出

トマト果実は液体窒素中で粉碎し、新鮮重の5倍量の抽出緩衝液（7 M グアニジン-HCl、1% サルコシル、1.44 M  $\beta$ -メルカプトエタノール、25 mM クエン酸 3 ナトリウム）を加えて懸濁した。等量のフェノール/クロロホルム（1:1, v/v）で3回抽出し、その後等量のクロロホルムで1回抽出した。核酸は抽出液の1/20量の5 M NaCl と2.5倍量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心後回収した沈殿は、少量の滅菌水に溶かし、1/3量の10 M LiClを加え、総RNAを沈殿させた。総RNAからのポリ A<sup>+</sup> RNAの精製は mRNA purification kit（ファルマシア社）を用いて行った。

### 2-1-1-3 PCRによる可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の増幅と分析

赤熟果実由来のポリ A<sup>+</sup> RNA 2  $\mu$ g を材料として、cDNA 合成キット（アマシャム社）により2本鎖 cDNA を合成した。この一部（約4ng）を鋳型としてPCRを行い、可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の増幅を行った。プライマーとして、精製した可溶性酸性インベルターゼのN末端アミノ酸配列に対応する17mer、64組み合わせの合成ヌクレオチド [5'-TA (A/G/C/T) GC (A/G/C/T) GTCCA (T/C) TG (A/G) TC-3']、および成熟インベルターゼ蛋白のN末端部に近接すると推定されるインベルターゼ共通配列（Sturm and Chrispeels, 1990;  $\beta$ -fructosidase motif）に対応する14mer、32組み合わせの合成ヌクレオチド [5'-CC (A/G) TT (A/G/C/T) GG (A/G) TC (A/G) TT-3'] を用いた。PCRは *Taq* polymerase（Takara 社）存在下、Thermal cycler（Perkin-Elmer 社）を用い、94°C、1分；35°C、2分；72°C、2分の反応を25回繰り返して行った。増幅されたPCR産物は、T4 DNA polymeraseによる平滑末端化処理後、プラスミドベクターpUC18の *Hinc* II サイトにサブクローニングし、塩基配列を後述の方法により決定した。

### 2-1-1-4 cDNA ライブラリーの作製とスクリーニング

成熟果実由来のポリ A<sup>+</sup> RNA からの2本鎖 cDNA の合成は、上記と同様

に行った。λ gt10 ファージライブラリーの作製は、cDNA クローニングキット（アマシャム社）を用いて行った。4.5 x 10<sup>4</sup> 個のファージをプレートに展開し、ナイロン膜（Hybond N+, アマシャム社）に転写し、末端標識（Sambrook et al., 1989）した合成 DNA をプローブに用い陽性プラークを選抜した。ハイブリダイゼーション、洗浄等は、渡辺・杉浦（1989）の方法によった。合成 DNA [5'-TCAAAAAAATTGGATGAACG-3']は、PCR により増幅された可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の塩基配列を基に作製した。陽性プラークは、寒天ごと回収し、500μl の SM 緩衝液（50mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1M NaCl, 7mM MgSO<sub>4</sub>, 0.01%ゼラチン）に懸濁後、その 2~10μl を λgt10 プライマー（Takara 社）を用いた PCR 反応に供し、0.5μg/ml の臭化エチジウムを含む 1%アガロースゲル電気泳動によりインサート DNA の長さを測定した。2kbp 以上の長いインサート DNA を有するクローンは、プレートライセート法（Sambrook et al., 1989）により DNA を抽出し、プラスミドベクター pBluescript KS+（Stratagene 社）の *Bam*HI サイトへサブクローニングした。

#### 2-1-1-5 塩基配列解析

単離した cDNA に対する一連のデリーションクローンは、ベクター、pBluescript KS+の *Sma* I, *Sac* I サイトを利用して作製した（Kilo-Sequence 用 Deletion Kit, Takara 社）。目的とするプラスミドを持つ大腸菌は、50mg/ml のアンピシリンを含む LB 液体培地（Sambrook et al., 1989）中で一晩培養し、2~5ml の培養液からアルカリ変性法（Sambrook et al., 1989）によりプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA は 50μl の TE に溶解し、これに 1μl の RNase A 溶液（0.5mg/ml）を加え、37°C で 30 分間保温後、30μl の PEG 液（20% PEG6000, 2.5M NaCl）を加え、氷上で 1 時間静置した。遠心後、回収した沈殿は 70%エタノールで数回洗浄し、少量の滅菌水に溶解した。精製したプラスミド DNA 1μg はジデオキシ法によるシーケンス反応（Tag DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI 社）に供し、DNA シーケンサー（373A, ABI 社）を用いて塩基配列を決定し

た。配列の連結、解析は、GENETYX ソフトウェア (ソフトウェア開発株式会社) により行った。

## 2-1-2 結果および考察

### 2-1-2-1 PCR による可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の単離

精製酵素より決定された N 末端 6 残基のアミノ酸配列 (第 1 章、図 1-2-3)、および Sturm and Chrispeels (1990) により報告されたインベルターゼ共通配列 ( $\beta$ -fructosidase motif) を基に、合成プライマー混合物を作製し、PCR による可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の増幅を試みた。その結果、トマト成熟果実由来の cDNA より約 60bp の DNA が増幅された (図 2-1-1)。この断片の塩基配列 (図 2-1-2) は、先に Sturm and Chrispeels (1990) により単離されたニンジン細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA の塩基配列と約 79% の相同性を有していた。また、塩基配列から推定したアミノ酸配列は、精製した可溶性酸性インベルターゼの N 末端配列 (第 1 章、図 1-2-3) との比較で 11 残基中 7 残基が一致した (図 2-1-2)。一致しない 4 残基については、精製酵素の N 末端配列解析時の誤差 (第 1 章、第 2 節) に起因するのかもしれない。以上の結果は、PCR により増幅した DNA がトマト果実可溶性酸性インベルターゼ遺伝子の一部であることを示すものと考えられる。

### 2-1-2-2 可溶性酸性インベルターゼ cDNA の単離と構造解析

PCR により増幅された可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の塩基配列 (図 2-1-2) を基に合成プローブを作製、赤熟果実 mRNA より作製した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、53 個の陽性クローンを得た。これらのクローンのうち、最も長いインサートを有するクローン、pAiv-1 についてその塩基配列を決定した (図 2-1-3)。cDNA, Aiv-1 の全長は 2339bp であり、553 アミノ酸残基に相当する読み枠が見いだされた (図 2-1-3)。推定アミノ酸配列の N 末

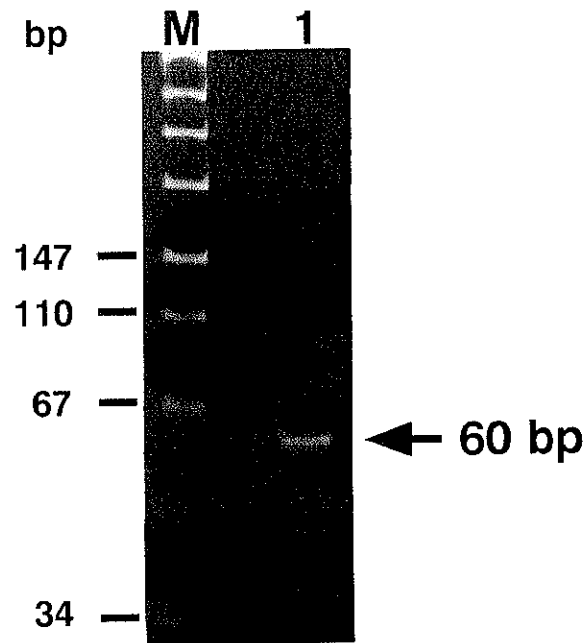


図2-1-1 PCRにより増幅された可溶性酸性インペルターゼ遺伝子断片

赤熟果実由来のポリA<sup>+</sup> RNAより合成した2本鎖cDNAを鋳型とし、合成プライマー混合物（材料および方法、2-1-1-3）存在下でPCRを行った。PCR産物（レーン1）および分子マーカー（M）は、8% PAGEで分離後、0.5 $\mu$ g/mlの臭化エチジウムにより染色した。

A:        5'    GGACGGCTTACCATTTTCAACCTCAAAAAAATTGG    3'  
 B:                T   A   Y   H   F   Q   P   Q   K   N   W  
 C:                -   -   -   D   -   -   C   -   -   M   D

**図2-1-2 PCR産物より推定されたアミノ酸配列と精製可溶性酸性インペルターゼのN末端配列との類似性**

A : PCR産物の部分塩基配列。 B : PCR産物の部分塩基配列より推定されたアミノ酸配列。 C : 精製可溶性酸性インペルターゼのN末端配列。Bの配列と一致するアミノ酸残基は横棒 (-) で示す。

ATGGCCACTCAGTGTATTGACCCCGAAAACCTCCGCCTCTCGTTACACATTACTCCCGGATCAACCCGATTCCGGCCACCGGAAAGTCCCTT	90
M A T Q C Y D P E N S A S R Y T L L P D Q P D S G H R K S L	30
AAAAATCATCTCCGGCATTTTCTCTCCGTTTTCTTTTCTTTCTGTAGCCTTCTTTCCGATCCTCAACAACAGTACCAGGACTTGCAA	180
K I I S G I F L S V F L L L S V A F F P I L N N Q S P D L Q	60
ATCGACTCCCCTCCGGCCGCCCGCTCAAGAGGTGTTTCTCAGGGAGTCTCCGATAAACTTTTCGAGATGTAGCCGGTGTAGTAC	270
I D S R S P A P P S R G V S Q G V S D K T F R D V A G A S H	90
GTTTCTTATGCGTGGTCCAATGCTATGCTTAGCTGGCAAAGAACGGCTTACCAATTTTCAACCTCAAAAAAATGGATGAAACGATCCTAAT	360
V S Y A W S N A M L S W Q R T A Y H F Q P Q K N W M <b>NDPN</b>	120
→	
GGACCATTTGATCACAAGGGATGGTACCACCTTTTTTATCAATACAATCCAGATTCAGCTATTTGGGAAATATCAGATGGGCCATGCT	450
<b>G</b> P L Y H K G W Y H L F Y Q Y N P D S A I W G N I T W G H A	150
←	
GTATCAAAGGACTTGATCCACTGGCTCTACTTGCCTTTTGCATGGTTCCTGATCAATGGTATGATATTAACGGTGTCTGGACAGGCTCC	540
V S K D L I H W L Y L P F A M V P D Q W Y D I N G V W T G S	180
GCTACCCTCCTACCCGATGGTCAGATCATGATGCTTATACCCGGTGACACTGATGATTATGTGCAAGTGCAAAATCTTGCCTACCCCGCC	630
A T I L P D G Q I M M L Y T G D T D D Y V Q V Q N L A Y P A	210
AACTTATCTGATCCTCTCCTTCTAGACTGGTCAAGTCAAAGGCAACCCGGTCTGGTCTCCACCCGGCATGGTGTCAAGGACTTT	720
N L S D P L L L D W V K F K G N P V L V P P P G I G V K D F	240
AGAGACCCGACTACTGCTTGGACCGGACCAAAAATGGCAATGGCTGTTAAACATCGGCTAAGATTGGTAAAAACGGGTGTTGCACTT	810
R D P T T A W T G P Q N G Q W L L T I G S K I G K T G V A L	270
GTTTATGAACTTCAACTTCAACAGCTTAAAGCTATTGGATGGAGTGTGATGCGGTTCCGGGTACGGGTATGTTGGGAGTGTGGGAC	900
V Y E T S N F T S F K L L D G V L H A V P G T G M <b>WECVD</b>	300
TTTTACCCGGTACTACTAAAAAACAACGGTGGACACATCATATAACGGGCCGGGTGTAAGCATGTGTTAAAAGCAAGTTAGAT	990
F Y P V S T K K T N G L D T S Y N G P G V K H V L K A S L D	330
GACAATAAGCAAGATCATTATGCTATTGGTACGTATGACTTGGGAAAGCAAAATGGACACCCGATAACCCGGAAATGGATTGTGGAATT	1080
D N K Q D H Y A I G T Y D L G K N K W T P D N P E L D C G I	360
GGGTTGAGACTAGACTATGGGAAATATTATGCATCAAAGACTTTTTATGACCCGAAGAAAGAACGAAGACTGTGGGGATGGATTGGG	1170
G L R L D Y G K Y Y A S K T F Y D P K K E R R V L W G W I G	390
GAAACTGACAGTGAATCTGCTGACCTGCAGAAAGGGATGGGCATCTGTACAGAGTATTCCAAGGACAGTCTTACGACAAGAAGACAGGG	1260
E T D S E S A D L Q K G W A S V Q S I P R T V L Y D K K T G	420
ACACATCTACTCAGTGGCCAGTGGAAAGAAATTGAAAGCTTAAAGAGTGGGTGATCCTACTGTTAAGCAAGTCGATCTTCAACAGGCTCA	1350
T H L L Q W P V E E I E S L R V G D P T V K Q V D L Q P G S	450
ATTGAGCTACTCCGTGTTGACTCAGCTGCAGGTTGGATATAGAAGCCTCATTTGAAGTGGACAAAGTCGCGCTTACGGGAATAATTGAA	1440
I E L L R V D S A A E L D I E A S F E V D K V A L Q G I I E	480
GCAGATCATGATGTTTCAAGTGTCTACTAGTGGAGGTGCTGCTAGCAGAGGCATTTTGGGACCATTTGGTGTATAGTAATTGCTGAT	1530
A D H V G F S C S T S G G A A S R G I L G P F G V I V I A D	510
CAAAACGCTACTGAGCTAACGCCAGTTTACTTTTACATTTCTAAAGGAGCTGATGGTCTGCAGAGACTCACTTCTGTGCTGATCAAACT	1620
Q T L S E L T P V Y F Y I S K G A D G R A E T H F C A D Q T	540
AGGTTTCTTTTCTATCTGGCACAATTAATTTGCTCTTGTAAAATGGAGATGGATAAAAGTAGCGGGTGTGATCTGATATATGCAGAT	1710
R F A F L S G T I N L S L	553
CCTCTGAGGCTCCGGGAGTTGGTAAACAAGTTTATGGTAGTTCAGTACCTGTGTTGGACGGTGAAAAACATTCATGAGATTATGGTGG	1800
ATCACTCAATTGGAGAGCTTTGCTCAAGGAGGAAGAACAGTCATAACATCGCGAATTTACCAACAAGGCAAGTAAATGGAGCAGCAC	1890
GACTCTTTGTTTCAACAATGCCACAGGGCTAGCGTTACTGCCTCCGTCAAGATTTGGTCACTTGTGAGTCACTAATATTCAATCCTTCC	1980
CTTTGCAAGACTGTAATCTTCTTTATTTCTGTTTTTTTTCTTTTCTTTTCAATTGAAAGTATTTCACCGACGTCCTCAAGAAAGGGGAAG	2070
AGGGAGATCAATATATGATGTTATTCCGCTACCTTAGGATTAGATGTATCATAGCAATGTCAAATCTAGTAGATATCAATGATG	2160
GGTTCCTGGAAACCGAGTAGAGCTTACTGGATTCTATGTAACCTAAGAAAGCTCAGCAATATATGCACAAATAATTACAG	2339

図2-1-3 トマト (*L. esculentum*) の赤熟果実より単離した、可溶性酸性インベルターゼをコードするcDNA, Aiv-1の塩基配列および推定アミノ酸配列

成熟型可溶性酸性インベルターゼのN末端部 (図1-2-4) に相当するアミノ酸配列は青字で示す。インベルターゼ共通配列 ( $\beta$ -fructosidase motif; NDPNG) および活性中心付近の高度保存配列 (WECPD) は枠内赤字で示す。Klann et al. (1992) により単離されたcDNA, TIV1には認められない挿入配列は、緑字 (5'端から1623bp下流) で示す。PCRクローニング (図2-1-1) は、矢印の間で実施した。



端部には、92 残基よりなる長いリーダー配列が認められた。その下流、成熟ポリペプチドに対応する 461 残基中には、精製した可溶性酵素（第 1 章、図 1-2-3）の N 末端配列、インベルターゼ共通配列（NDPNG）および活性中心付近の高度保存配列（WECVD）が見いだされた。保存配列中にバリン残基が存在し（Roitsch et al., 1995）、かつ、cDNA にコードされる蛋白質の計算上の等電点が酸性（5.21）であることは、Aiv-1 のコードするインベルターゼが可溶性酵素であることを示唆している（Sturm and Chrispeels, 1991）。Aiv-1 の推定アミノ酸配列と既知酸性インベルターゼのアミノ酸配列間の類似性を基に作成した系統樹において、Aiv-1 のコードする蛋白質が種々の植物の可溶性酸性インベルターゼと類似しているという結果（図 2-1-4）は、この可能性を支持するものと考えられる。

cDNA, Aiv-1 の塩基配列は、先に Klann et al. (1992) により単離されたトマト果実酸性インベルターゼ cDNA, TIVI の塩基配列とほぼ一致していたが、Aiv-1 の 5' 端から 1623bp 下流に、TIVI には認められない 86bp の挿入配列が見いだされた（図 2-1-3）。挿入配列中の 5' 端および 3' 端にはイントロンの共通配列（5' GT・・AG 3'）が認められることから、得られた Aiv-1 cDNA は、スプライシング中の可溶性酸性インベルターゼ前駆体 mRNA あるいは alternative splicing による可溶性酸性インベルターゼ isoform の mRNA をコードすると考えられた。長いインサートを有する可溶性酸性インベルターゼ cDNA クローン 36 個を PCR により分析したところ、挿入配列を有していたものは 2 個のみであり、可溶性酸性インベルターゼ mRNA 中に占める挿入配列型の mRNA の比率は非常に低いものと推測された。

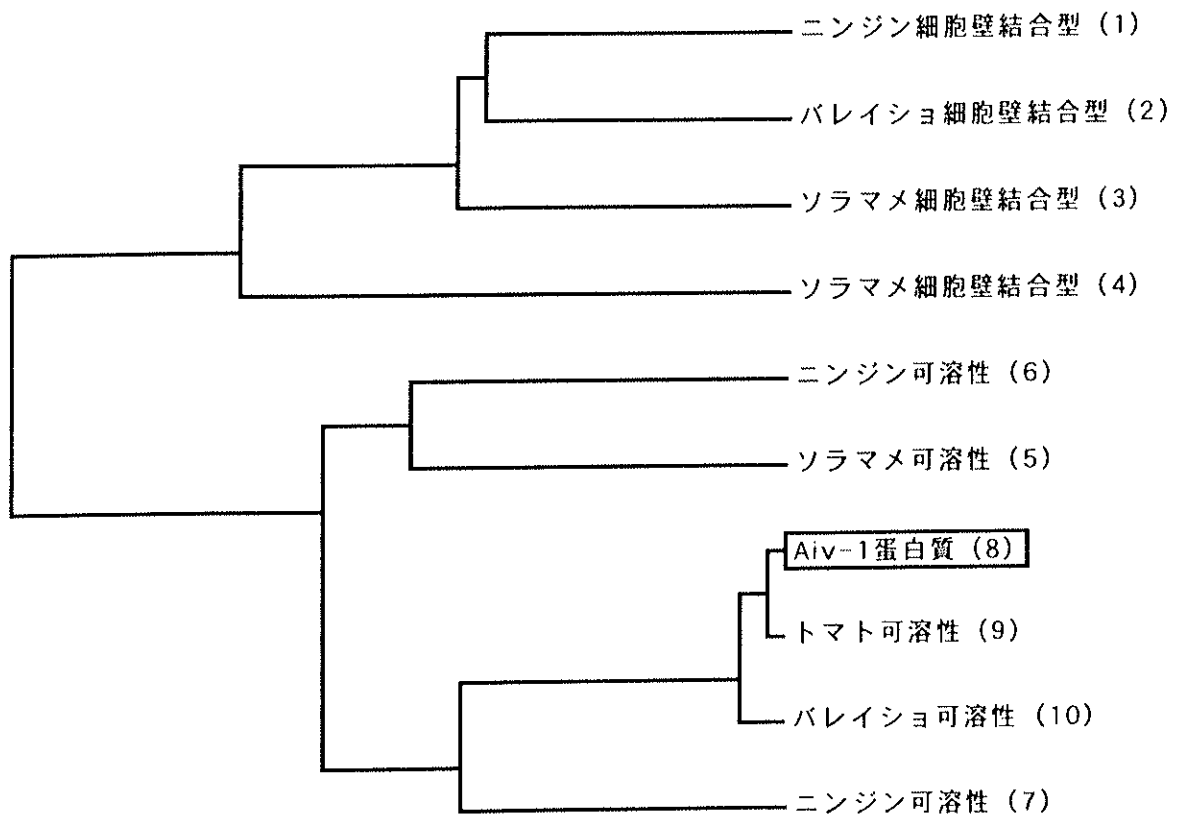


図2-1-4 植物酸性インベルターゼアミノ酸配列間の類似性を基に作成した系統樹

デンドログラムの作成は、GENETYXソフトウェア（ソフトウェア開発株式会社）中のUPGMA法により行った。各種酸性インベルターゼアミノ酸配列の由来: (1), GenBank/EMBL/DDBJ accession number M58362 (Sturm and Chrispeels, 1990); (2), Z22645 (Hedley et al., 1994); (3, 4, 5), Z35162, Z35163, Z49831 (Weber et al., 1995); (6, 7), X67163, X75352 (Unger et al., 1994); (8), Aiv-1蛋白質; (9), M81081 (Klann et al., 1992); (10), L29099 (Zhou et al., 1994)

## 第2節 可溶性酸性インベルターゼ遺伝子の果実発育ステージ別の発現様式およびサザンブロット分析

第1節において単離した cDNA をプローブとして、ノーザンブロット分析を行い、トマトおよび野生種果実の発育ステージ毎の可溶性酸性インベルターゼ mRNA 存在量の推移、2種の果実間における mRNA 存在量の差異について調査し、前章第1節において測定した活性が mRNA レベルでの制御下にあるかどうかを確認した。併せて、2種トマトにおける mRNA 存在量の差異が遺伝子コピー数に由来するのかどうかをサザンブロット分析により調査した。

### 2-2-1 材料および方法

#### 2-2-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」および野生種の未熟葉および果実を抽出材料として使用した。これらは液体窒素中で磨砕後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で使用時まで保存した。

#### 2-2-1-2 ノーザンブロット分析

総 RNA の抽出は、前節（第2章、第1節）に準じて行った。1レーン当たり  $3\mu\text{g}$  の総 RNA をグリオキサール-DMSO による変性条件下で泳動し（1%アガロースゲル）、Genescreen Plus（NEN Products 社）ナイロン膜に転写した。膜への転写、ハイブリダイゼーションおよび洗浄は、Genescreen Plus に添付の方法（NEN Products 社）に従って行った。プローブとして、単離した cDNA, Aiv-1（約 2.3kbp）をマルチプライム法（Sambrook et al., 1989）により  $^{32}\text{P}$  で標識したものを使用した。

### 2-2-1-3 サザンブロット分析

DNA の抽出は、Murray and Thompson (1980) の方法に従った。DNA (10 $\mu$ g/レーン) は、制限酵素 *Bam*H I, *Bgl* II, *Eco*R I あるいは *Eco*R V で消化し、0.8%アガロースゲルで分離した。ゲルはアルカリブロットイング (Sambrook et al., 1989) によりナイロン膜 (Hybond N+, アマシャム社) に転写し、2x SSC で洗浄後、風乾し、ハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーション、洗浄等は Church and Gilbert (1984) の方法に従った。プローブは、Aiv-1 cDNA (約 2.3 kbp) あるいは Aiv-1 の 3'断片 (約 490bp) を <sup>32</sup>P でマルチプライム標識したものを使用した。Aiv-1 の 3'断片は、Aiv-1 cDNA 3ng を鋳型とし、2種のプライマー、5'-TAGCGGGTTGTTGATCTG-3'および 5'-CCAGGAACCCATACATIG-3'を用いた PCR により増幅した。PCR の条件は、94  $^{\circ}$ C、1分 ; 55  $^{\circ}$ C、2分 ; 72  $^{\circ}$ C、3分 ; 25回とした。

### 2-2-2 結果および考察

トマト果実においては、可溶性酸性インベルターゼ活性の上昇とほぼ同時期、すなわち果実の成熟期 (開花後 50~60 日) に mRNA 存在量の著しい増大が認められた (図 2-2-1)。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 (図 2-2-1)。これらの結果は、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していた。

完全長の Aiv-1 cDNA をプローブとしたサザンブロット分析の結果、野生種ゲノムからは複数 (3~5) 本のバンドが検出されたが (図 2-2-2A)、Aiv-1 の 3' 部をプローブとした際にはバンド数が 2~3 本に減少した (図 2-2-2B)。この結果は、完全長の Aiv-1 プローブを用いた際に検出される複数のバンドが、野生種ゲノム中の可溶性酸性インベルターゼ遺伝子の 3'あるいは 5'部に由来することを示している。また、Aiv-1 の 3'部プローブにより得られたパターンは、

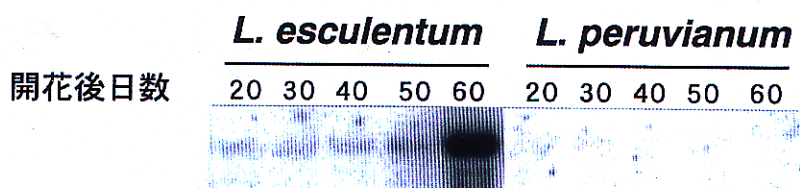


図2-2-1 果実における可溶性酸性インベルターゼ遺伝子発現のノーザンプロット分析

1レーン毎に、開花後20～60日の果実より抽出した総RNA 3 $\mu$ gを供試した。RNAは、グリオキサール-DMSO変性下で1%アガロースゲル電気泳動により分離後、ナイロン膜に転写した。膜は<sup>32</sup>Pで標識したAiv-1 cDNAとハイブリダイズさせた。

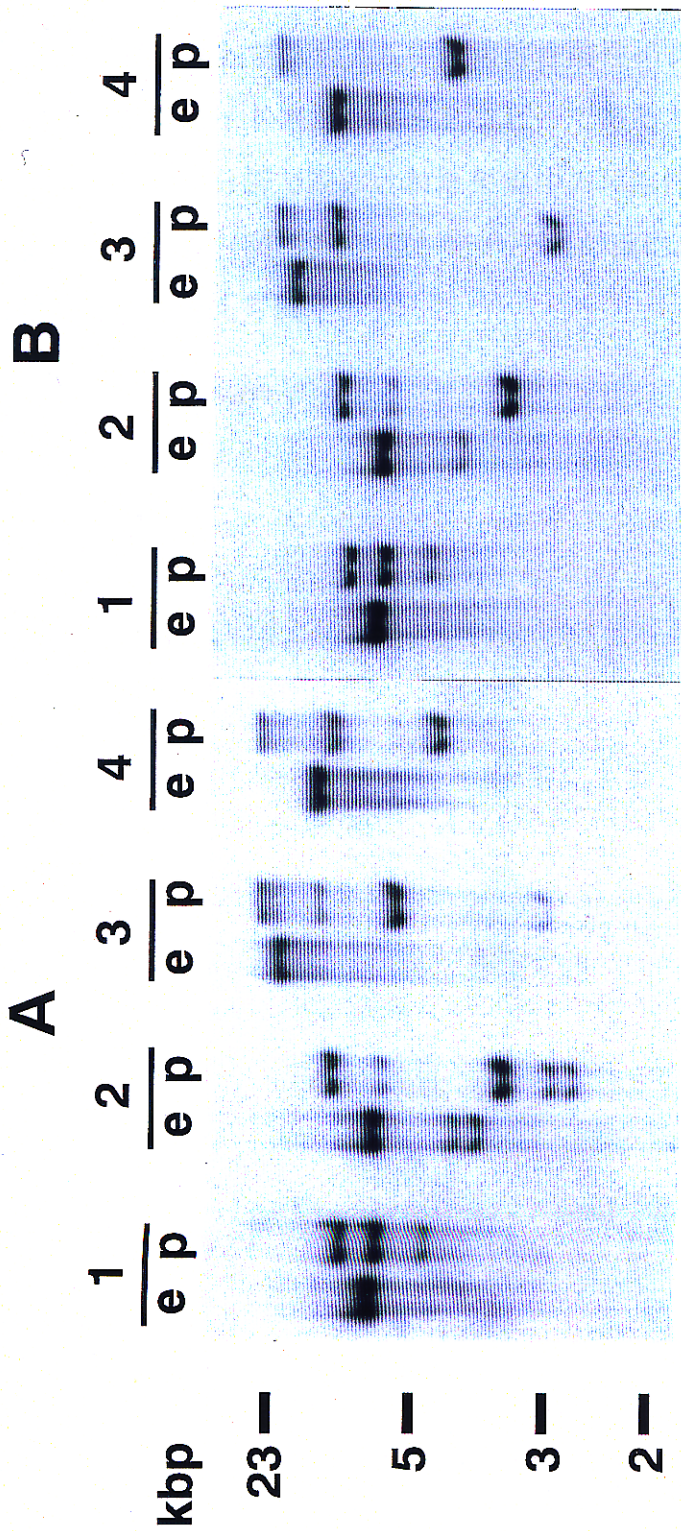


図2-2-2 Aiv-1 cDNAをプローブとしたサザンブロット分析

トマト *L. esculentum* (e) および野生種 *L. peruvianum* (p) 由来のゲノムDNA (10 µg/レーン) は、制限酵素 *Bam*HI (1), *Bgl*II (2), *Eco*R I (3), あるいは *Eco*R V (4) で消化し、0.8% アガロースゲルで分離後、ナイロン膜に転写した。膜は<sup>32</sup>Pで標識したAiv-1 cDNA (A) あるいはAiv-1 cDNAの3'領域 (B) とハイブリダイズさせた。

野生種ハプロイドゲノム当たりの同酵素遺伝子のコピー数が1あるいは2であることを示唆していた。一方、栽培種ゲノムより検出されたバンド数は極めて少なく、栽培種トマトゲノム中の可溶性酸性インベルターゼ遺伝子は、野生種と同様、ハプロイド当たり1～2コピーであると考えられた（図 2-2-2A）。従って、ノーザン分析で観察された果実中の可溶性酸性インベルターゼ mRNA 存在量の種間差異（図 2-2-1）は、それぞれの種における遺伝子のコピー数によるものでないと考えられた。

## 摘要

1) 精製酵素より決定された N 末端アミノ酸配列、および既知のインベルターゼ共通配列 ( $\beta$ -fructosidase motif) を基に、合成プライマー混合物を作製し、PCR による可溶性酸性インベルターゼ遺伝子断片の増幅を行った。増幅された DNA の塩基配列を基に合成プローブを作製し、赤熟果実 mRNA 由来の cDNA ライブラリーから完全なコード領域を有する cDNA、Aiv-1 を単離した。Aiv-1 の推定アミノ酸配列は、種々の植物可溶性酸性インベルターゼと高い類似性を示し、配列中には、 $\beta$ -fructosidase motif (NDPNG) および植物の可溶性酸性インベルターゼで高度に保存された配列 (WECVD) が見いだされた。また、Aiv-1 のコードする蛋白質の等電点は酸性であった。これらの結果は、Aiv-1 のコードするインベルターゼが可溶性酵素であることを示唆している。

2) Aiv-1 の塩基配列は、既報のトマト果実酸性インベルターゼ cDNA の塩基配列とほぼ一致していたが、配列中に 86bp のイントロン由来の挿入配列が見いだされた。この結果は、Aiv-1 がスプライシング中の酸性インベルターゼ前駆体 mRNA あるいは alternative splicing による酸性インベルターゼ isoform の mRNA をコードすることを示唆している。

3) Aiv-1 cDNA をプローブとして、果実各ステージにおけるノーザンブロット分析を実施した。栽培種果実においては、活性の上昇 (第 1 章、図 1-1-2) と同時期 (開花後 50~60 日) に mRNA 存在量の著しい増大が認められた。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。トマトおよび野生種ゲノム中の可溶性酸性インベルターゼ遺伝子のコピー数は、いずれの種においてもハプロイド当たり 1~2 個と推定された。従って、2 種トマト果実間で観察された可溶性酸性インベルターゼ mRNA 存在量の差異は、それぞれの種における遺伝子数に起因するものではないと考えられた。