

第3章 可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子導入 による可溶性酸性インベルターゼの生理的機能の推定

はじめに

本章では、第2章で単離した可溶性酸性インベルターゼ遺伝子のアンチセンス遺伝子を作製してトマトに導入し、得られた形質転換体の解析により可溶性酸性インベルターゼの機能を解明しようとした。第1節では、前章で単離した可溶性酸性インベルターゼ遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入した形質転換トマトの作出を行い、第2節では、形質転換トマトにおける可溶性酸性インベルターゼ mRNA の発現と活性の変化について調査した。第3節では、得られた形質転換トマトの果実における糖分析および他形質の調査を行い、可溶性酸性インベルターゼの生理的機能について考察した。

第1節 可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子の構築 とトマトへの導入

ナス科植物の形質転換には、土壌細菌 *Agrobacterium* を介した方法が広く用いられる。本節では、市販のバイナリーベクター pBI121 (Clontech Laboratories, Inc., USA) を用いて可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子を構築し、*Agrobacterium* を介したリーフディスク法によりトマトの形質転換を行った。得られた形質転換トマトはサザンブロット分析により導入遺伝子の有無、コピー数を調査した。

3-1-1 材料および方法

3-1-1-1 アンチセンス遺伝子導入用ベクター (pBTI-2) の構築

第2章、第1節において単離した可溶性酸性インベルターゼ cDNA, Aiv-1 をベクターの構築に使用した。バイナリーベクター pBI 121 (Clontech Laboratories, Inc.) を制限酵素 *Sma* I と *Sac* I で消化し、 β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子が切り出されたベクターアームを得た。これに、組換え pBluescript KS+上から制限酵素 *Sma* I、*Sac* I により切り出された cDNA, Aiv-1 を連結し、ベクター pBTI-2 を作製した (図 3-1-1)。

3-1-1-2 *Agrobacterium* を用いたトマトの形質転換

上記ベクター、pBTI-2 は、まず大腸菌 JM109 に導入し、次いで、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株に三系交配法 (内宮, 1990) により導入した。pBTI-2 を導入した *Agrobacterium* は、50mg/ml のカナマイシンを含む YEB 培地 (0.5%牛肉エキス、0.1%酵母エキス、0.5%ペプトン、0.5%ショ糖) 中で一晚培養 (28°C) し、トマトの形質転換に使用した。無菌的に発芽させたトマト品種「ハウスおどりこ」の子葉を切断し、上記 *Agrobacterium* 培養液に浸した後、1mg・

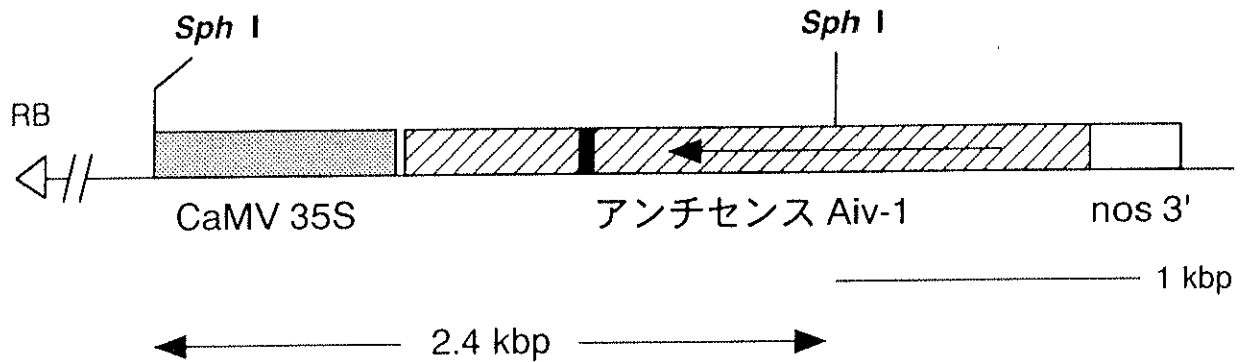


図3-1-1 バイナリーベクターpBTI-2の構造

サザンブロット分析で利用した制限酵素*Sph*I サイトは図中に示す。アンチセンス遺伝子（アンチセンスAiv-1）は、3'下流にノパリン合成酵素遺伝子のポリA配列（nos 3'）を連結し、CaMV 35Sプロモーター（CaMV 35S）の制御下で発現させた。黒塗りの箇所は、Aiv-1 cDNA中のイントロン由来の挿入配列を示す。図に示した以外の箇所の構造は、バイナリーベクターpBI121と同じである。LBおよびRBは、それぞれT-DNAの左および右の境界配列を示す。

liter⁻¹のゼアチンを含む MS (Murashige and Skoog, 1962) 寒天培地 (MSZ 培地) 上で2日間静置した。その後、子葉切片を 500mg・liter⁻¹カルベニシリン、50mg・liter⁻¹カナマイシンを含む MSZ 培地に移し、25℃、24時間日長下でさらに培養した。再分化した植物体 (AS-IV-4, -6, -7, -8, -9) は、250mg・liter⁻¹カルベニシリンを含む MS 培地に移植し、生長させた後、鉢上げした。ベクター pBI 121 を保持する *Agrobacterium* により形質転換されたトマト (S-BG-1)、および非形質転換トマトは、いずれも対照として使用した。形質転換トマト (AS-IV-4, -6, -7, -8, -9, S-BG-1) および非形質転換トマトは野菜・茶業試験場の閉鎖系温室で栽培した。果実成熟ステージは、トマト果実のカラー分類表 (米国農務省) を用いて分類した。果実および成熟葉は、収穫後直ちに分析に使用した。

3-1-1-3 サザンブロット分析

形質転換トマトの未熟葉からの DNA 抽出、プロッティング、ハイブリダイゼーション等は、基本的に第2章、第2節の方法に準じて行った。電気泳動には、制限酵素 *Sph* I で消化したゲノム DNA (5μg/レーン) を供試した。プローブには、³²P でマルチプライム標識した cDNA, Aiv-1 を使用した。

3-1-2 結果および考察

カナマイシン耐性により選抜された再分化植物は、サザンブロット分析により導入遺伝子の有無、コピー数を調査した (図 3-1-2)。供試した5個体 (AS-IV-4, 6, 7, 8, 9) の全てにおいて、pBTI-2 上の *Sph* I 断片 (図 3-1-1) に由来する 2.4kbp のバンドが検出された (図 3-1-2)。従ってこれら5個体はアンチセンス遺伝子導入植物と考えられた。オートラジオグラム上の 2.4kbp 以外のバンドは、アンチセンス Aiv-1 中の *Sph* I サイトの3'下流から left border (LB) までの T-DNA、さらに LB に隣接した植物ゲノムまでも含むキメラ断片に由来するものである (図 3-1-1, 3-1-2)。従ってこれら 2.4kbp 以外のバンドの数は、反

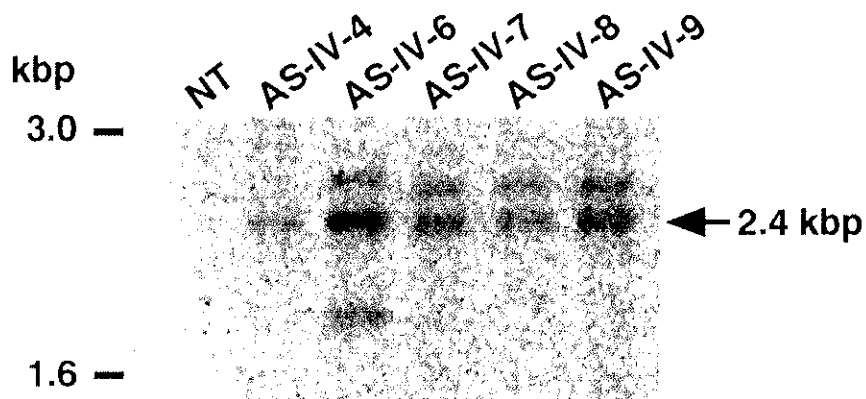


図3-1-2 サザンプロット分析によるアンチセンス遺伝子の検出

形質転換トマト (AS-IV-4, 6, 7, 8, 9) および対照の非形質転換トマト (NT) のゲノムDNA (5 μ g/レーン) を制限酵素 *Sph*I で消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した。膜は³²Pで標識した *Aiv-1* cDNA とハイブリダイズさせた。形質転換体のゲノムから、制限酵素 *Sph*I により切り出されたアンチセンス *Aiv-1* 遺伝子の一部と35Sプロモーターを含むキメラ断片 (約2.4 kbp) を矢印で示す。なお、内在の *Aiv-1* 遺伝子由来のバンドは全てのレーンに観察されたが、アンチセンス遺伝子由来のバンドと位置的に離れているため、この図では削除した。

復したマルチコピー遺伝子が挿入されない限り、導入遺伝子のコピー数を反映すると考えることができる（図 3-1-1、3-1-2）。なお、AS-IV-4 は、今回のサザンブロット分析では 2.4kbp 以外の断片が観察されず（図 3-1-2）、コピー数が判別できなかったが、改めて *Hind* III 消化後、サザンブロット分析を行い、1 コピー遺伝子導入個体と確認された。AS-IV-6 は、サザンブロット分析により 2 コピーの完全なアンチセンス遺伝子を有することが確認されたが（図 3-1-2）、自殖次世代植物（ T_1 植物）は 3:1 分離を示した。従って AS-IV-6 は、2 遺伝子が染色体上の近傍に挿入された個体と考えることができる。

第2節 アンチセンス遺伝子を導入したトマトの葉および果実のRNA分析および酸性インベルターゼ活性測定

第1節で作出した形質転換トマトの果実における可溶性酸性インベルターゼの mRNA 存在量と、可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性を調査し、アンチセンス遺伝子発現による内在遺伝子発現の阻害の有無を確認しようとした。また、葉における細胞壁結合型および可溶性酸性インベルターゼ活性を測定し、アンチセンス遺伝子導入による葉中の活性への影響について調査した。

可溶性ならびに細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、傷害処理により上昇することが知られている (Matsushita and Uritani, 1974; Sturm and Chrispeels, 1990; Zhang et al., 1996)。酸性インベルターゼ活性の傷害誘導の意義については、傷害を受けた組織における呼吸の上昇 (Benhamou et al., 1991)、還元糖生成によるシグナル伝達 (Herbers et al., 1996) との関連が示唆されている。本節では、形質転換トマトの葉を用いて傷害処理を行い、アンチセンス遺伝子発現に伴う可溶性、細胞壁結合型酵素活性の傷害誘導パターンの変化をとらえることも併せて試みた。

3-2-1 材料および方法

3-2-1-1 植物材料

第1節において作出した可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子導入トマト (AS-IV-4, -6, -7, -8, -9; 導入品種「ハウスおどりこ」) および対照としての β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子導入トマト (S-BG-1; 導入品種「ハウスおどりこ」)、非形質転換トマト (品種「ハウスおどりこ」) を野菜・茶業試験場の閉鎖系温室で栽培した。各発育ステージの果実および成熟葉は、収穫後直ちに以下の実験に使用した。果実の発育ステージは、米国農務省の力

ラー分類表を用いて分類した。

3-2-1-2 ノーザンプロット分析

果実からのポリ A⁺RNA の抽出は、Fast TrackTM mRNA isolation kit (invitrogen 社, USA) を用いて行った。1 レーン当たり 1 μ g のポリ A⁺RNA を供試し、電気泳動、プロッティングおよびハイブリダイゼーションを第 2 章、第 2 節と同様に行った。

3-2-1-3 酸性インベルターゼの傷害誘導

成熟葉より切片 (10mm x 4mm) を切り出し、湿らせた濾紙をひいたシャーレに並べ、暗黒下、25 $^{\circ}$ C で保温した。

3-2-1-4 酵素活性測定

可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の測定は、第 1 章、第 1 節と同様に行った。

3-2-2 結果

3-2-2-1 アンチセンス遺伝子導入トマトの果実の RNA 分析および酸性インベルターゼ活性測定

対照の GUS 遺伝子導入トマト (S-BG-1) の果実における可溶性酸性インベルターゼ活性は、非形質転換トマトと同様、果実の成熟に伴い急激に増大した (図 3-2-1A)。一方、アンチセンス遺伝子導入トマト (AS-IV-7) の果実における活性は、非常に低いレベルで推移し、成熟に伴う活性増大も観察されなかった (図 3-2-1A)。果実中の可溶性酸性インベルターゼ mRNA 存在量は、S-BG-1 および AS-IV-7 果実間における活性の違いを反映しており (図 3-2-1B)、アンチセンス遺伝子導入トマト (AS-IV-7) の赤熟果実においては mRNA が検出

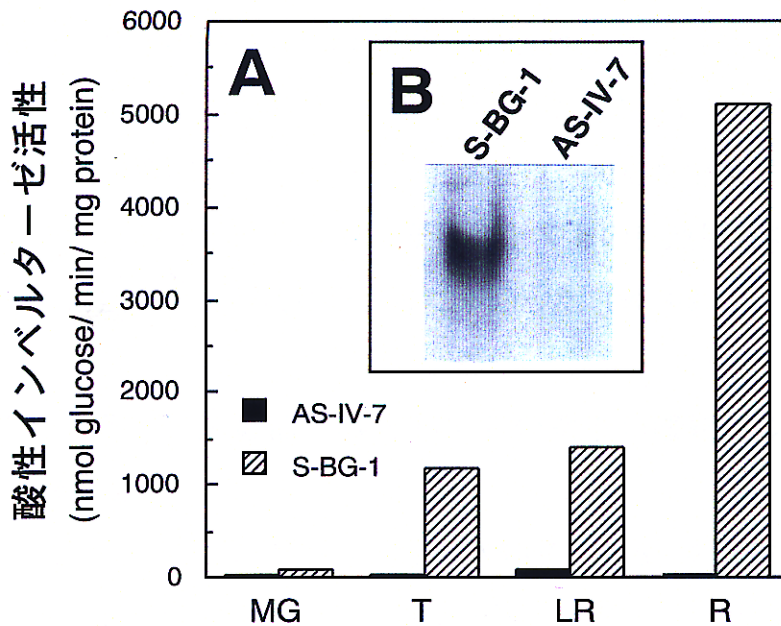


図3-2-1 形質転換トマト果実における可溶性酸性インペルターゼの発現

A: pBI121 (S-BG-1、対照のGUS形質転換トマト) あるいはpBTI-2 (AS-IV-7) により形質転換された果実における可溶性酸性インペルターゼ活性の変動。生育各ステージ (MG, Mature green; T, Turning; LR, Light red; R, Red) における果実を収穫し、可溶性酸性インペルターゼ活性を測定した。データは2反復の試験の平均値を示す。B: 形質転換果実のノーザンブロット分析。各レーンには、1 μ gの対照 (S-BG-1) あるいはpBTI-2形質転換体 (AS-IV-7) の赤熟果実由来のpolyA⁺RNA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し、ナイロン膜に転写した。ナイロン膜は³²Pで標識したAiv-1 cDNAとハイブリダイズさせた。

されなかった（図 3-2-1B）。

ここで得られた 5 個体のアンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性は、非形質転換トマト（NT）あるいは GUS 遺伝子導入トマト（S-BG-1）の赤熟果実中の活性の 1%以下であった。（表 3-2-1）。第 1 章、第 1 節に示したとおり、対照トマト（NT あるいは S-BG-1）の赤熟果実中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、可溶性酵素に比べ極めて低かった（表 3-2-1）。アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中の細胞壁結合型酵素活性は、対照果実中の活性をさらに下回った（表 3-2-1）。

3-2-2-2 アンチセンス遺伝子導入トマトの葉中の酸性インベルターゼ活性測定

アンチセンス遺伝子導入トマト（AS-IV-6, 7, 8）の成熟葉における可溶性酸性インベルターゼ活性は、GUS 遺伝子導入トマト（S-BG-1）の 20%程度にまで減少していた（表 3-2-2）。しかし、アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の減少は顕著ではなく、GUS 遺伝子導入トマトの約 40~80%の活性が残存していた（表 3-2-2）。

3-2-2-3 葉組織における酸性インベルターゼ活性の傷害誘導

非形質転換トマトの成熟葉中の可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、傷害処理により上昇した（図 3-2-2; NT）。可溶性酸性インベルターゼ活性は、傷害処理後 24 時間でほぼ最大値に達したが、細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、48 時間の傷害処理中増大し続けた（図 3-2-2; NT）。

アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉中の可溶性酸性インベルターゼ活性は、非形質転換トマト葉中の同酵素活性と比較して非常に低く、傷害誘導も殆ど認められなかった（図 3-2-2A; AS-IV-6, 7）。一方、アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉中の細胞壁結合型酵素活性は、傷害処理により顕著に上昇した（図 3-2-2B; AS-IV-6, 7）。また、細胞壁結合型酵素の傷害誘導パターン

表 3-2-1 アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの赤熟果実における酸性インペルターゼ活性

植物体	導入 DNA	酸性インペルターゼ活性 (nmol min ⁻¹ (g FW) ⁻¹)	
		可溶性画分	細胞壁画分
非形質転換トマト	—	7,490	67.2
(品種ハウスおどりこ、対照)		9,410	65.9
S-BG-1 (対照)	pBI121	5,420	49.3
		6,860	33.3
AS-IV-4	pBTI-2	86.4	N.D.
AS-IV-6	pBTI-2	96.0	N.D.
		33.6	12.2
AS-IV-7	pBTI-2	52.8	5.12
		<4.00	5.76
AS-IV-8	pBTI-2	<4.00	4.48
		<4.00	N.D.
AS-IV-9	pBTI-2	33.6	N.D.
		<4.00	N.D.
		9.60	N.D.

データは 2 反復の試験結果を併記した。 N.D.: 未検定

表 3-2-2 アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの成熟葉における酸性インペルターゼ活性

個体	導入 DNA	酸性インペルターゼ活性 (nmol min ⁻¹ (g FW) ⁻¹)		
		可溶性画分	細胞壁画分	
		%	%	
S-BG-1 (対照)	pBI121	617±34.3	186±33.7	100
AS-IV-6	pBTI-2	146±13.5	71.3±15.2	38.8
AS-IV-7	pBTI-2	121±17.2	148±19.9	80.4
AS-IV-8	pBTI-2	101±31.3	116±24.4	63.0

データは 4 反復の試験の平均値および標準誤差で示す。%は対照の値を 100 とした時の比率を表す。

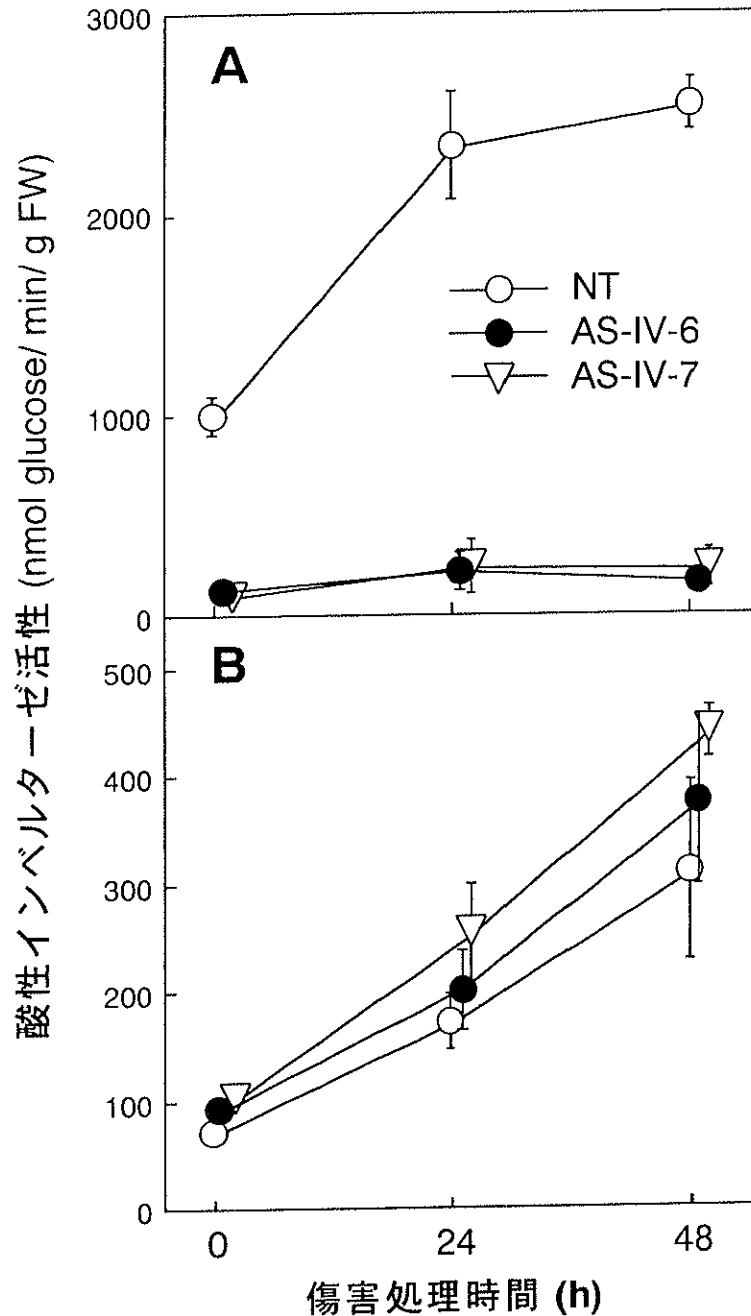


図3-2-2 酸性インベルターゼ活性の傷害誘導の経時的変化

非形質転換トマト (NT、対照) とpBTI-2形質転換トマト (AS-IV-6, 7) の成熟葉の切片を暗黒下25℃で48時間傷害処理した。葉切片の抽出液は、可溶性 (A) および細胞壁 (B) 画分に分け、それぞれの画分における酸性インベルターゼ活性を測定した。データは、3反復の試験の平均値および標準誤差を示す。

および活性レベルについては、アンチセンス遺伝子導入トマトと非形質転換トマトとの間に差異は認められなかった（図 3-2-2B; AS-IV-6, 7）。

3-2-3 考察

アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟果実中の可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、非形質転換トマトあるいは GUS 遺伝子導入トマトの果実中の活性と比較して非常に低かった（表 3-2-1）。アンチセンス遺伝子導入トマトの 1 個体、AS-IV-7 の果実における可溶性酸性インベルターゼ活性は、調査した全ての発育ステージにおいて非常に低かった。対照の GUS 遺伝子導入トマト、S-BG-1 の果実中の活性は、果実発育ステージの全てにおいて AS-IV-7 の活性を上回り、果実成熟期（Red stage）において著しく増大した（図 3-2-1A）。また、AS-IV-7 の赤熟果実中においては可溶性酸性インベルターゼ mRNA が検出されなかった（図 3-2-1B）。他のアンチセンス遺伝子導入トマトにおいても AS-IV-7 と同様の傾向が認められた。発育中のトマト果実における可溶性酸性インベルターゼ活性の増大は mRNA レベルで制御されていることが知られている（Klann et al., 1993; Sato et al., 1993; 図 1-1-2, 2-2-1）。従って、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実で観察された極めて低い可溶性酸性インベルターゼ活性は、同酵素の翻訳時のアンチセンス阻害に起因するものと考えられた。さらに、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実中の酸性インベルターゼ活性がほぼ完全に抑制された事実は（表 3-2-1）、果実中の酸性インベルターゼの殆どが 1 遺伝子に由来するという Yelle et al. (1991) の仮説を支持するものと考えられる。本試験に使用した形質転換トマトは、アンチセンス遺伝子のコピー数が 1 あるいは 2 であったが（図 3-1-2）、果実中の活性の抑制が非常に効果的に行われた（表 3-2-1）。この結果は、1 コピーのアンチセンス遺伝子の導入のみで活性のほぼ完全な抑制が可能であることを明確に示している。

アンチセンス遺伝子導入トマトの果実中の可溶性酸性インベルターゼ

活性は、対照果実の活性の1%以下まで抑制されており（表 3-2-1）、また葉中の可溶性酵素活性も対照の20%以下に減少していた（表 3-2-2）。しかし、アンチセンス遺伝子導入トマトの葉中の細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性の減少は顕著ではなかった（表 3-2-2）。さらに、傷害処理をしたアンチセンス遺伝子導入トマトの葉における可溶性酵素活性は殆ど抑制されていたが、細胞壁結合型酵素活性においては、対照との差は認められなかった（図 3-2-2）。アンチセンス遺伝子発現による翻訳阻害の程度は、アンチセンス遺伝子に対する対象 mRNA の相補性の高さに依存すると考えられる（Zrenner et al., 1996）。従って、上記の結果は、トマト葉において可溶性酸性インペルターゼ遺伝子 (*Aiv-1*) と塩基配列レベルでの類似性が低い細胞壁結合型酸性インペルターゼ遺伝子が発現していることを示すものと考えられる。

第3節 アンチセンス遺伝子を導入したトマトの葉および果実の特性

前節までに供試した5個体の形質転換トマトにさらに1個体を加え、糖分析、特性調査等を実施し、果実および葉に与えるアンチセンス遺伝子の効果について検証した。これらの結果を総合し、トマトにおける可溶性酸性インベルターゼの機能について考察した。

3-3-1 材料および方法

3-3-1-1 植物材料

第1節において作出した可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子導入トマト (AS-IV-4, -6, -7, -8, -9, -17; 導入品種「ハウスおどりこ」) および対照としての β -グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子導入トマト (S-BG-1; 導入品種「ハウスおどりこ」)、非形質転換トマト (品種「ハウスおどりこ」、「タイムリー」) を野菜・茶業試験場の閉鎖系温室で栽培した。果実は米国農務省のカラー分類表を用いて分類後、収穫し、使用時まで-80℃で保存した。成熟葉は、収穫後直ちに糖分析に使用した。

3-3-1-2 糖分析

可溶性糖類の含量は、第1章、第1節に記載の方法により求めた。果汁の可溶性固形物含量は、示差屈折計 (N-1、アタゴ社) により測定した。

3-3-1-3 酵素活性測定

果実からの粗抽出液の調製は、可溶性酸性インベルターゼ抽出 (第1節、第1章) と同様に行った。アルカリ側 pH におけるインベルターゼ活性測定は、反応液中の 0.5M 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 緩衝液を 50mM HEPES-KOH (pH 7.5)

緩衝液に交換した以外は、酸性インベルターゼ活性測定（第1節、第1章）に準じて行った。ショ糖合成酵素活性は、前記粗抽出液を用いて Hubbard et al. (1989) の方法により測定した。ただし、反応液中の緩衝液は、Hepes-KOH (pH 8.3) 緩衝液を使用した。

3-3-2 結果

3-3-2-1 アンチセンス遺伝子導入トマトの果実内糖組成

GUS 遺伝子導入トマト (S-BG-1) の赤熟果実は多量の還元糖を含み、ショ糖は極めて少なかった (表 3-3-1)。これに対し、アンチセンス遺伝子導入トマトでは赤熟果実中のショ糖含量は顕著に増大し、還元糖量は減少していた (表 3-3-1)。果実中の全可溶性糖含量に占めるショ糖の割合 (ショ糖%) は、アンチセンス遺伝子導入トマト間により著しく異なった (表 3-3-1)。しかし、形質転換果実中のショ糖%あるいはショ糖含量と可溶性酸性インベルターゼ残存活性との間には相関は認められなかった (表 3-2-1、3-3-1)。アンチセンス遺伝子導入トマトの果実においては、緑熟期 (Mature green stage) において既にショ糖含量の増大が認められた (表 3-3-2)。

3-3-2-2 アンチセンス遺伝子導入トマトの果実中の可溶性固形物含量

上記解析で使用したアンチセンス遺伝子導入トマトに新たに AS-IV-17 を追加し、果実中の可溶性固形物含量を測定した (表 3-3-3)。AS-IV-17 は、サザンブロット分析は未実施であるが、PCR によりアンチセンス遺伝子の存在が確認された個体である。AS-IV-17 の赤熟果実中の可溶性糖含量は、ショ糖 $18.8\text{mg (g FW)}^{-1}$ 、ブドウ糖 $10.2\text{mg (g FW)}^{-1}$ 、果糖 $9.88\text{mg (g FW)}^{-1}$ であった (数値は 2 反復の試験の平均値)。

アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中の可溶性固形物含量は、個体間で差異が著しく (表 3-3-3)、アンチセンス遺伝子の有無、赤熟果実中のシ

表 3-3-1 アンチセンス *Aiv-J* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの赤熟果実中の糖含量

個体	導入 DNA	可溶性糖含量 (mg (g FW) ⁻¹)			全可溶性糖類	全可溶性糖濃度 ($\mu\text{mol Glucose (g FW)}^{-1}$)
		シロ糖 (%)	ブドウ糖 (%)	果糖 (%)		
S-BG-1 (対照)	pBI121	1.75 (4.11)	19.6 (46.1)	21.1 (49.6)	42.5	236
AS-IV-4	pBTI-2	1.14 (2.61)	20.7 (47.5)	21.8 (50.0)	43.6	243
AS-IV-6	pBTI-2	5.41 (11.6)	20.9 (44.8)	20.3 (43.6)	46.6	260
AS-IV-7	pBTI-2	7.60 (17.8)	17.6 (41.1)	17.6 (41.1)	42.8	240
AS-IV-8	pBTI-2	11.7 (46.8)	6.47 (25.9)	6.80 (27.2)	25.0	142
AS-IV-9	pBTI-2	18.0 (48.1)	9.13 (24.4)	10.3 (27.5)	37.4	213
AS-IV-10	pBTI-2	4.80 (11.7)	18.5 (45.0)	17.8 (43.3)	41.1	230
AS-IV-11	pBTI-2	4.93 (10.2)	21.6 (44.9)	21.6 (44.9)	48.1	269
AS-IV-12	pBTI-2	5.25 (17.9)	11.9 (40.5)	12.2 (41.5)	29.4	164
AS-IV-13	pBTI-2	3.56 (9.75)	16.0 (43.8)	16.9 (46.3)	36.5	203
AS-IV-14	pBTI-2	3.84 (11.3)	15.0 (44.1)	15.2 (44.7)	34.0	190
AS-IV-15	pBTI-2	6.57 (15.8)	17.4 (41.9)	17.5 (42.2)	41.5	232

データは 2 反復の試験結果を併記した。括弧内%は全可溶性糖含量を 100 とした時の比率を表す。

表 3-3-2 アンチセンス *Avv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの緑熟期果実中の糖含量

個体	導入 DNA	可溶性糖含量 (mg (g FW) ⁻¹)			全可溶性糖濃度 (μmol Glucose (g FW) ⁻¹)	
		シヨ糖 (%)	ブドウ糖 (%)	果糖 (%)	全可溶性糖類	
S-BG-1 (対照)	pBI121	0.70 (1.89)	17.8 (48.0)	18.6 (50.1)	37.1	206
AS-IV-6	pBTI-2	8.76 (26.2)	12.1 (36.2)	12.5 (37.4)	33.4	188
AS-IV-7	pBTI-2	7.73 (22.7)	13.0 (38.1)	13.4 (39.3)	34.1	192

括弧内%は全可溶性糖含量を 100 とした時の比率を表す。

表 3-3-3 アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの赤熟果実の可溶性固形物含量

植物体	導入 DNA	果実の糖蓄積型	可溶性固形物含量 (° Brix)
非形質転換トマト (品種タイムリー、対照)	—	H	6.6
非形質転換トマト (品種ハウスおどりこ、対照)	—	H	6.4
S-BG-1 (対照)	pBI121	H	7.2
AS-IV-4	pBTI-2	H	7.3
AS-IV-6	pBTI-2	S	5.6
AS-IV-7	pBTI-2	H	6.0
AS-IV-8	pBTI-2	H	5.9
AS-IV-9	pBTI-2	H	6.5
AS-IV-17	pBTI-2	S	7.7

可溶性固形物含量は 2 あるいは 3 反復の試験の平均値で示す。

S: ショ糖含量が全可溶性糖含量の 30%を越えるもの (ショ糖蓄積型)

H: ショ糖含量が全可溶性糖含量の 30%未満 (還元糖蓄積型)

ショ糖含量あるいは果実中の可溶性酸性インベルターゼ残存活性のいずれとの間にも相関を見いだすことはできなかった（表 3-2-1、3-3-1、3-3-3）。供試したアンチセンス遺伝子導入トマトの果実は、ショ糖含量の違いにより明確に2つの型 [表 3-3-3; ショ糖含量が全可溶性糖含量の 30%を越えるもの（ショ糖蓄積型, S）、30%未満（還元糖蓄積型, H）] に分類できるが、可溶性固形物含量とこれら糖蓄積型との間にも相関は見いだせなかった。

3-3-2-3 アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中のショ糖分解酵素活性

本実験に供した可溶性酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中のショ糖合成酵素（sucrose synthase）活性は、対照植物果実中の活性とほぼ同程度であった（表 3-3-4）。一方、弱アルカリ pH でのインベルターゼ活性は、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実において著しく減少していた（表 3-3-4）。

3-3-2-4 アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉の糖組成

GUS 遺伝子導入トマト、S-BG-1 と比較して、アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉中のショ糖含量は増大した（表 3-3-5）。また、還元糖量、全可溶性糖含量および全可溶性糖濃度は減少した（表 3-3-5）。

3-3-2-5 アンチセンス遺伝子導入トマトの生育

アンチセンス遺伝子導入により、葉中の可溶性酸性インベルターゼ活性は著しく減少し（表 3-2-2、図 3-2-2）、葉中の糖組成も変化した（表 3-3-5）、アンチセンス遺伝子導入トマトの生育、形態は正常であり、非形質転換トマトとの差異は特に見いだせなかった（図 3-3-1A, B）。また、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実中の酸性インベルターゼ活性、ショ糖含量には顕著な変化が見いだされた（表 3-2-1、3-3-1）、果実の発育、成熟状態ともに非形質転換ト

表 3-3-4 アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの赤熟果実中の
 ショ糖合成酵素活性および pH 7.5 におけるインベルターゼ活性

個体	導入 DNA	活性 (nmol min ⁻¹ (g FW) ⁻¹)	
		ショ糖合成酵素	pH 7.5 における インベルターゼ活性
S-BG-1 (対照)	pBI121	66	780
AS-IV-6	pBTI-2	24	<5.0
AS-IV-7	pBTI-2	34	37
AS-IV-8	pBTI-2	79	43

表 3-3-5 アンチセンス *Atv-1* 遺伝子 (pBTI-2) 導入トマトの成熟葉中の可溶性糖含量

個体	導入 DNA	可溶性糖含量 (mg (g FW) ⁻¹)			全可溶性糖類 ($\mu\text{mol Glucose (g FW)}^{-1}$)
		シヨ糖 (%)	ブドウ糖 (%)	果糖 (%)	
S-BG-1 (対照)	pBI121	1.53 (10.2)	3.55 (23.7)	9.95 (66.3)	83.9
AS-IV-6	pBTI-2	2.37 (31.5)	1.08 (14.4)	4.07 (54.1)	42.4
AS-IV-7	pBTI-2	3.23 (24.8)	2.25 (17.3)	7.55 (58.1)	73.3
AS-IV-8	pBTI-2	2.68 (19.1)	2.72 (19.4)	8.59 (61.4)	78.4
AS-IV-9	pBTI-2	2.11 (44.1)	0.48 (10.0)	2.19 (45.8)	27.1

括弧内%は全可溶性糖含量を 100 とした時の比率を表す。

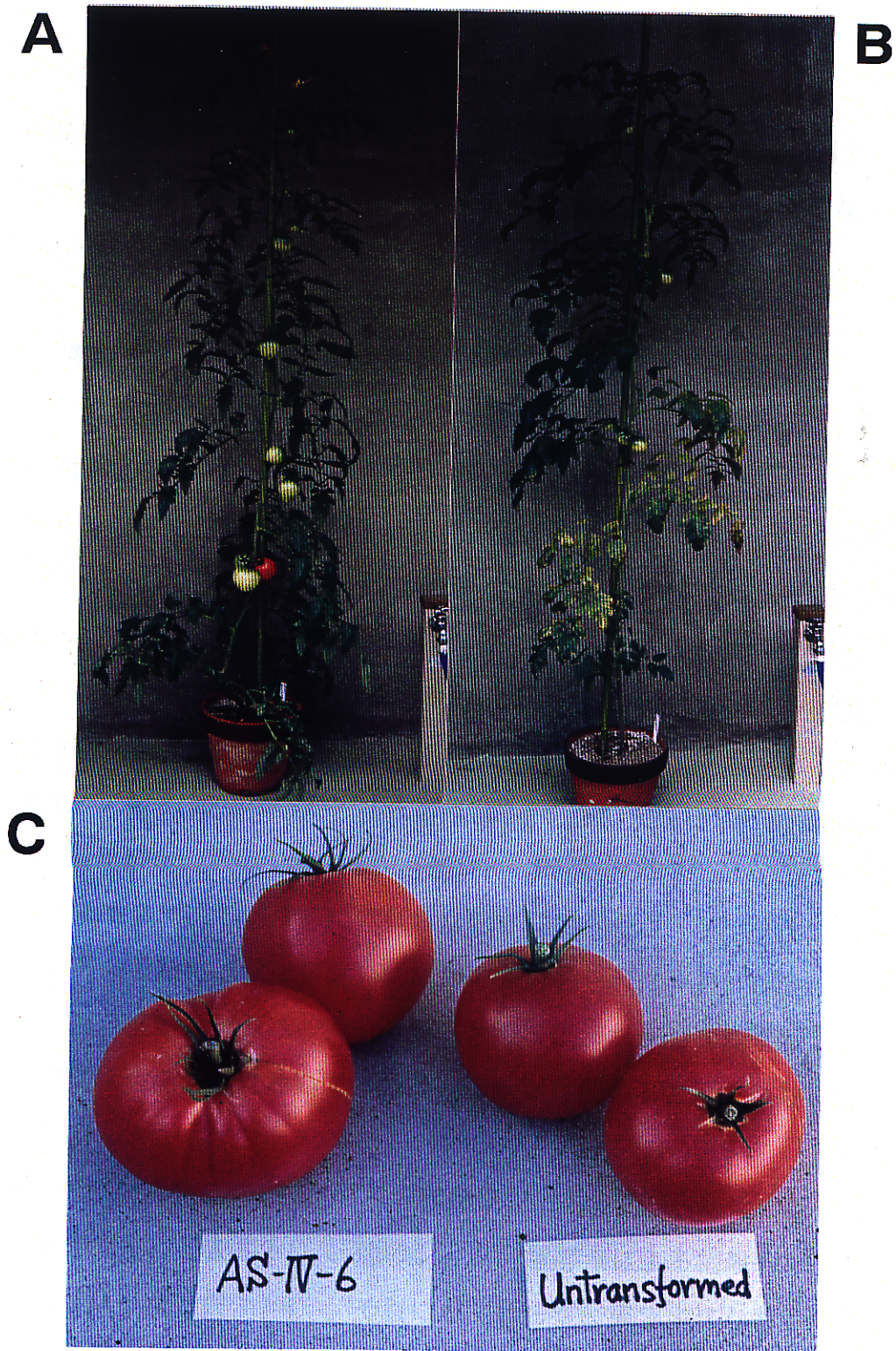


図3-3-1 アンチセンス遺伝子 (pBTI-2) を導入したトマトの生育

A : pBTI-2により形質転換されたトマト (AS-IV-8)。 B : 非形質転換トマト (品種ハウスおどりこ)。 C : pBTI-2により形質転換されたトマト (AS-IV-6) の果実 (左) および非形質転換トマト (品種ハウスおどりこ) の果実 (右)。

マトとの違いは見いだせなかった（図 3-3-1C）。アンチセンス遺伝子導入トマトの果実の生重も非形質転換トマトとほぼ同じであった（遺伝子導入植物果実、54~124 g; 対照果実、81~120 g）。

3-3-3 考察

3-3-3-1 可溶性酸性インベルターゼと糖組成について

ショ糖含量は GUS 遺伝子導入トマト（対照）の果実中では極めて低かったが、アンチセンス遺伝子を有するトマトの果実においては著しく増大した（表 3-3-1）。一方、トマトの果実中の主要糖類である還元糖は、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実においてはその量が減少した（表 3-3-1）。以上の結果は、トマト果実の液胞中に局在する高レベルの可溶性（液胞型）酸性インベルターゼが液胞へのショ糖蓄積を妨げるという、従来からの仮説（Manning and Maw, 1975; Miron and Schaffer, 1991; Yelle et al., 1991; Stommel, 1992; Klann et al., 1993）を強く支持するものである。さらに、同様な糖組成の変化は、アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉（ソース葉）においても認められた（表 3-3-5）。これらの結果は、可溶性酸性インベルターゼが、果実のようなシンク器官およびソース器官（成熟葉）の何れにおいても糖組成の制御に関わることを示唆するものである。

アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実においては、酸性インベルターゼ活性は殆ど消失し（表 3-2-1）、他のショ糖分解酵素による補償的な活性上昇も認められなかった（表 3-3-4）。それにも関わらず、果実中になおも多量の還元糖を蓄積していた結果（表 3-3-1）は非常に興味深い。GUS 遺伝子導入トマト、S-BG-1 の緑熟期（Mature green stage）果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性は、成熟期果実と比較して非常に低かったが（図 3-2-1A）、果実中の糖の殆どは還元糖であった（表 3-3-2）。この結果は、GUS 遺伝子導入トマトの緑熟期果実中に認められる低レベルの可溶性酸性インベルターゼが、多量のショ糖を

分解しうることを示唆している。従って、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実で観察された比較的多量の還元糖が、非常に低レベルの可溶性酸性インペルターゼ残存活性（図 3-2-1A、表 3-2-1）により生成された可能性は十分に考えられる。

3-3-3-2 可溶性酸性インペルターゼ活性と果実の生育について

トマト果実中の可溶性酸性インペルターゼの生理的意義に関しては、特に果実の成熟期にその発現が著しいことから、シンク能（シンク容量およびシンク活性）のうち特に細胞肥大（シンク容量の増大）、あるいは果実の成熟過程に関与する可能性が指摘されている（Sun et al., 1992）。しかし、本実験に供したアンチセンス遺伝子導入トマトの果実は、可溶性酸性インペルターゼ活性が殆ど抑制されていた（表 3-2-1）にも関わらず、非形質転換トマト果実と同様な発育を示し、着色減、発育不良等の異常は認められなかった（図 3-3-1C）。また、アンチセンス遺伝子導入トマトの果実個々の生重、全可溶性糖含量（表 3-3-1）、全可溶性糖濃度（表 3-3-1）についても対照との顕著な差異は認められなかった。果実中の可溶性固形物含量については、アンチセンス遺伝子導入トマトの個体間においてかなりの差異が認められたが（表 3-3-3）、赤熟果実中のショ糖含量、可溶性酸性インペルターゼ残存活性、果実の糖蓄積型などと、可溶性固形物含量との間に相関を見いだすことはできなかった（表 3-2-1、3-3-1 および 3-3-3）。さらに、アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実においては、酸性インペルターゼ以外のショ糖分解酵素による補償的活性上昇は認められなかった（表 3-3-4）。これらの結果は、トマト果実の成熟期に観察される高いショ糖分解酵素活性、すなわち可溶性酸性インペルターゼ活性（図 1-1-2, 3-2-1A）の殆どが、果実成熟期のシンク能あるいは成熟過程の維持に関与していないことを示唆している。

なお、弱アルカリ側 pH でのインペルターゼ活性は、アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実において著しく減少していた（表 3-3-4）。この結果は、

トマト赤熟果実中の弱アルカリ側 pH でのインベルターゼ活性の大部分がアルカリ性あるいは中性インベルターゼでなく、可溶性酸性インベルターゼに由来することを示唆している。

3-3-3-3 アンチセンス遺伝子を導入したトマト植物体の生育

供試したアンチセンス遺伝子導入トマトにおいては、果実以外に、成熟葉（ソース葉）の可溶性酸性インベルターゼ活性の抑制が観察された（表 3-2-2）。また、葉中の可溶性酵素の抑制に伴い、成熟葉中の糖組成、全可溶性糖含量、全可溶性糖濃度についても変化が認められた（表 3-3-5）。これら酵素、代謝物レベルにおける明白な変化にも関わらず、アンチセンス遺伝子導入トマトは、非形質転換トマトと同様、正常な生育を示した（図 3-3-1）。この理由としては、供試したアンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉における各糖類の含量（表 3-3-5）が、葉中の炭水化物代謝を維持する上で十分である可能性が第一に考えられる。特にショ糖は転流糖の主要形態であり、アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉におけるショ糖含量の増大（表 3-3-5）自体が植物の生長に悪影響を及ぼすことは考えにくい。光合成能については、葉に集積した糖によりフィードバック的阻害を受けるという仮説（Gifford and Evans, 1981）と、ショ糖の蓄積が光合成の阻害には直接的には関与しない可能性を示唆する研究結果がこれまで得られており（Goldschmidt and Huber, 1992）、本章の試験に用いたアンチセンス遺伝子導入トマトあるいはその後代の光合成速度等の測定により、今後確認する必要があると思われる。

摘要

単離した可溶性酸性インベルターゼ遺伝子 Aiv-1 を利用してアンチセンス遺伝子を構築し、トマト品種「ハウスおどりこ」に導入した。アンチセンス遺伝子の導入が確認された6個体について各種特性を調査した。

1) アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性は、対照に比べ99%以上減少していた。また、アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実においては可溶性酸性インベルターゼ mRNA は殆ど検出されなかった。従って、これら遺伝子導入トマトの果実で観察された酵素活性の顕著な減少は、内在遺伝子発現のアンチセンス阻害によるものと考えられた。

2) アンチセンス遺伝子導入トマトにおいては、果実と同様、葉においても可溶性酸性インベルターゼ活性の大幅な減少が認められた。しかし、葉の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性については大きな影響が認められなかった。この傾向は、傷害処理葉においてより顕著であった。以上の結果は、葉における細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子の発現が、アンチセンス遺伝子の影響を受けなかったことを示唆している。

3) 対照と比較して、アンチセンス遺伝子導入トマトの葉および果実中のショ糖含量は増大し、還元糖量は減少していた。また、アンチセンス遺伝子導入個体の植物体の生育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かった。これらの結果は、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）において糖組成を制御する主要因の1つであることを示唆すると共に、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が、果実発育、シンク能の維持にとって必須ではないことを示している。