

第4章 トマト細胞壁結合型酸性インペルターゼ cDNA の単離と解析

はじめに

前章第2節において、トマト葉における酸性インペルターゼアイソザイム（細胞壁結合型インペルターゼ）の存在が示唆された。そこで、本章では、トマト葉を材料とした同酵素遺伝子（cDNA）の単離、構造解析を行った。栽培中のトマトの葉においては細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性は極めて低いことから（第1章、表1-1-2 および第3章、図3-2-2、表3-2-2）、傷害誘導処理をした成熟葉より抽出した mRNA を cDNA 作製に使用した。実験を行った当時、*Lycopersicon* 属植物の細胞壁結合型酸性インペルターゼ遺伝子は未単離であったため、最初に Roitsch et al. (1995) が *Chenopodium* 培養細胞から cDNA 断片を増幅した際に使用した植物インペルターゼ間で共通性の高いアミノ酸配列 (H(L/F)FYQYNP) を利用して PCR を行い、トマト細胞壁結合型酸性インペルターゼ遺伝子断片を単離することを試みた。得られた遺伝子断片を用いて cDNA ライブラリーをスクリーニングし、完全なコード領域を含むクローン pWiv-1 を単離した。

4-1-1 材料および方法

4-1-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」の成熟葉（ソース葉）および未熟葉、ならびに野生種の未熟葉を使用した。

4-1-1-2 PCR による細胞壁結合型酸性インペルターゼ遺伝子断片の単離

第3章、第3節に従い12時間傷害誘導処理をしたトマト品種「ハウス

おどりこ」の成熟葉(ソース葉)より、ポリ A⁺RNA を Fast TrackTM mRNA isolation kit (Invitrogen 社) により単離した。1μg のポリ A⁺RNA を用いて 2 本鎖 cDNA を合成し (cDNA 合成キット、アマシャム社)、約 2-4ng の 2 本鎖 cDNA を鋳型として PCR 反応を行った。PCR は、Ex Taq polymerase (Takara 社) と合成プライマーを含む総量 20μl の反応系で行った。2 種の合成プライマー [5'-CCTTCAC (C/T) T (A/G/C/T) TT (C/T) TA (C/T) CA (A/G) TA (C/T) AA (C/T) CC-3' および 5'-TC (G/A/T/C) (A/G) (G/C) (A/G) CA (T/C) TCCCA-3'] は、植物インベルターゼにおいて高度に保存されているアミノ酸配列 [H (L/F) FYQYNP (Roitsch et al., 1995) および WEC (P/V) D] を基に作製した。PCR の条件は、94 °C、1 分間; 55 °C、1 分間; 72 °C、1 分間; 45 回とした。増幅された断片は直接 pT7 Blue T-vector (Novagen 社) にサブクローニングした。

4-1-1-3 トマト細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA の単離

96 時間傷害誘導処理をしたトマトのソース葉より、第 2 章、第 1 節に記載の方法に準じて総 RNA を抽出した。総 RNA からのポリ A⁺ RNA の精製は Dynabeads mRNA purification kit (日本ダイナル社) を用いて行った。2 μg のポリ A⁺ RNA を用いて 2 本鎖 cDNA を合成後 (Timesaver cDNA synthesis kit; ファルマシアバイオテック社)、EcoR I 消化した λZAP II アーム (Stratagene 社) に連結し、ライブラリーを作製した。約 1.4 x 10⁵ 個の組換えファージプラークをナイロン膜 (Hybond N+; アマシャムジャパン社) に転写し、PCR により単離した細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子断片 (約 450bp) をプローブとしてスクリーニングした。プローブの標識、ハイブリダイゼーション、洗浄等は、第 2 章、第 2 節に記載の方法 (サザンブロット分析) に従い行った。単離したクローンは、*in vivo* excision に供し、得られた pBluescript (Stratagene 社) ファージミドは、大腸菌 SOLR 系統の形質転換に使用した。cDNA の塩基配列の決定および解析は、第 2 章、第 1 節に記載の方法により行った。

4-1-1-4 サザンブロット分析

トマト品種「ハウスおどりこ」および野生種の未熟葉からの DNA 抽出、制限酵素消化、プロッティング等は第 2 章、第 2 節と同様に行った。

4-1-2 結果

合成プライマー混合物を用いた PCR により約 450bp の断片が増幅され、その塩基配列はバレイショ葉の細胞壁結合型酸性インベルターゼと高い相同性を有していた。この断片をプローブとして、傷害誘導処理をしたトマトのソース葉から構築した λ ZAP II cDNA ライブラリーをスクリーニングし、cDNA、Wiv-1 を単離した。Wiv-1 cDNA の塩基配列 (1872 bp) を図 4-1-1 に示す。Wiv-1 は、ポリ A 配列を含む 3' 端配列の一部を欠失していたが、開始コドンから停止コドンまでの完全なコード領域 (1749bp) を有していた (図 4-1-1)。コード領域は 582 個のアミノ酸残基より構成され、このポリペプチドの計算上の分子量は 65,772、等電点は 9.47 であった (図 4-1-1)。推定アミノ酸配列中には、 β -fructosidase motif (Sturm and Chrispeels, 1990; NDPNG)、および活性中心のシステイン残基 (Sturm and Chrispeels, 1990) を中心とした高度保存配列 (WECPD) が見いだされた (図 4-1-1)。この高度保存配列中には、植物の細胞壁結合型酸性インベルターゼに共通して認められるプロリン残基 (Roitsch et al., 1995) が存在していた。Wiv-1 の推定アミノ酸配列は、遺伝子 *Lin5*, *Lin6*, *Lin7*, *Lin8* によりコードされるトマト細胞壁結合型酸性インベルターゼの部分配列 (Godt and Roitsch, 1997) とそれぞれ 72.5%, 97.1%, 75.5%, 77.5% の類似性を有していた。

Wiv-1 より推定された蛋白質のアミノ酸配列と他植物の酸性インベルターゼのアミノ酸配列との類似性を基に作成した系統樹を図 4-1-2 に示す。作成したデンドログラムは、Wiv-1 にコードされた蛋白質が、可溶性酵素よりも細胞壁結合型酵素の方に類似することを示していた (図 4-1-2)。

Wiv-1 cDNA をプローブとしたサザンブロット分析の結果を図 4-1-3 に

| | |
|---|------|
| TTTTAACACAAAAAGAAAGATTAAAGATGGAGATTTAAGAAAATCTTCTCTTTGGGCTTGGCCAATCTTGTGTGTGTTCTT | 90 |
| M E I L R K S S S L W A L P I L V L C F F | 21 |
| TATCAACAATGGAGTATTTGTGATGCTTCTCACAAAGTTTATATGCACCTTGCAATCTACTACTAGTCATGTTGATGCTAGCAAGGCTCA | 180 |
| I N N G V F V D A S H K V Y M H L Q S T T S H V D A S K V H | 51 |
| TAGAAGTGGTTATCATTTTCAACCTCTAAAAATGGATTAAACGATCCAATGGTCCAATGTATTACAACGGAGTGACCATCTATTTTA | 270 |
| R T G Y H F Q P P K N W I N D P N G P M Y Y N G V Y H L F Y | 81 |
| CCAGTACAACCCAAAAGGAGCAACATGGGGCAACATTGTTGGGCTCATTAGTCTCAAAGGACTTGATCAACTGGATCCCGCTCGAAC | 360 |
| Q Y N P K G A T W G N I V W A H S V S K D L I N W I P L E P | 111 |
| CGCTATCTACCGTCTAAAGTATTTGACAAGTACGGTACATGGTCCGGTCCAGCAATCTTACCAGGCAACAAGCCTGTGATCCTCTA | 450 |
| A I Y P S K V F D K Y G T W S G S A T I L P G N K P V I L Y | 141 |
| CACTGGAATTTGGATGCTAACAAAACACAAGTCCAAAACCTACGCAATCCAGTAAACATGTCTGATCCATATCTTCGTAAGTGGACAA | 540 |
| T G I V D A N K T Q V Q N Y A I P A N M S D P Y L R K W I K | 171 |
| GCCCATAAACAATCCATTGATTGTCGGGCAAAAACATAAATAAAATCCAATTCGCGATCCAACAACAGCTTGGATGGGCGAGAGATGG | 630 |
| P D N N P L I V A D K N I N K I Q F R D P T T A W M G R D G | 201 |
| ATACTGGAGAGTATTGGTTGGGAGTGTGAGGAATCACAGGGGAAAAGTTATAATGTACAAGAGTAATAAGAACTTCATGAAATGGACAAA | 720 |
| Y W R V L V G S V R N H R G K V I M Y K S N K N F M K W T K | 231 |
| AGCTAAACACCCACTCCAAGTCTCAGGCTACTGGGAATGGGAATGCTCTGATTTTTTTCCAGTGTCAATGAAAATGAAAATGGTTT | 810 |
| A K H P L H S A Q G T G N W E C P D F F P V S L K N E N G L | 261 |
| GGACACGTCGTACGATGGAAAAGATGTTAAACATGTTCTTAAAGTTAGCTTTGATGTTACGAGGTTTGTACTACTATACAGTTGGTACGTA | 900 |
| D T S Y D G K D V K H V L K V S F D V T R F D H Y T V G T Y | 291 |
| CGACACAAAAAGGATAAGTACTTCCGGATAACACTTCTATTGATGGATGGAAGGATGGGACTTGATTACGGTAATTATTACGGCTC | 990 |
| D T K K D K Y F P D N T S I D G W K G L G L D Y G N Y Y A S | 321 |
| CAAGAGTCTTTGATAGTGGCAAGAATCGTAGGATTTTATTGGGTTGGGCTAATGAATCAGATACTGTTGATAACGATGAAAAAAGG | 1080 |
| K T F F D S G K N R R I L L G W A N E S D T V D N D V K K G | 351 |
| ATGGCCGGGTTCCACCTATTCTCGTAAATATGGCTTATCTAGTGGGAAACAATTGGTTCAATGGCTGTTCAAGAATTAGAAAC | 1170 |
| W A G V H P I P R K I W L D P S G K Q L V Q W P V Q E L E T | 381 |
| ACTAAGAAAAGAAAAGGTTCAATTAATAACAAAAATGAAACAAGGGAGAAAAGGTTGAAATCAAAGGAATCACAGTTGCACAGGCTGA | 1260 |
| L R K K K V Q L N N K K L N K G E K V E I K G I T V A Q A D | 411 |
| CGTTGAAGTATTTCTCATTCCGGAGTTTAGACAAGGAGCCATTGATTCTAGTTGGGCTGATCTTTATGCGCAAGATGATGCGC | 1350 |
| V E V I F S F A S L D K A E P F D S S W A D L Y A Q D V C A | 441 |
| CATTAAGGTTCAACGGTTCAAGTGTCTTGGGCTTTGGGCTTCTAACTTTGGCTTCTAAAACTTGAAGAATACACACCCGTTTT | 1440 |
| I K G S T V Q G G L G P F G L L T L A S K N L E E Y T P V F | 471 |
| CTTCAAGTCTTCAAGGCTCATGATAATTACAAGGTTCTCATGTGTTCCGATGCCTCAAGGCTCAAGCCTAAAGAATGAAACTACTATGTA | 1530 |
| F R V F K A H D N Y K V L M C S D A S R S S L K N E T T M Y | 501 |
| TAAACCATCATTTGCTGGATACGTAGATGTAGATTAGCAGACAAGAAATGTCTCTTAGAAGTTTGATTGATAAATCGATAGTGGAAA | 1620 |
| K P S F A G Y V D V D L A D K K L S L R S L I D N S I V E S | 531 |
| TTTTGGTCTGGAGGAAAACGTGCATTACATCAAGGTTTATCCAACGTTGGCGATATTTGATAAAGCACATTTATCGCCTTCAACAA | 1710 |
| F G A G G K T C I T S R V Y P T L A I F D K A H L F A F N N | 561 |
| TGGCGAGAGACGATCACAATTGAGACTCTAAATGCTTGGAGCATGGCTAATGCTAAGTTGCACTAGAACGTTTTTATCTTATTATGCC | 1800 |
| G A E T I T I E T L N A W S M A N A K L H | 582 |
| ACGTCAAAAGAAACCATAGTATAGAAATTTAACTTGCAAGTATTGATAAATGATGCAATTTTTTTAAAATA | 1872 |

図4-1-1 栽培トマト (*L. esculentum*) の傷害処理葉より単離した、細胞壁結合型酸性インベルターゼをコードするcDNA, Wiv-1の塩基配列および推定アミノ酸配列

インベルターゼ共通配列 (β -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。

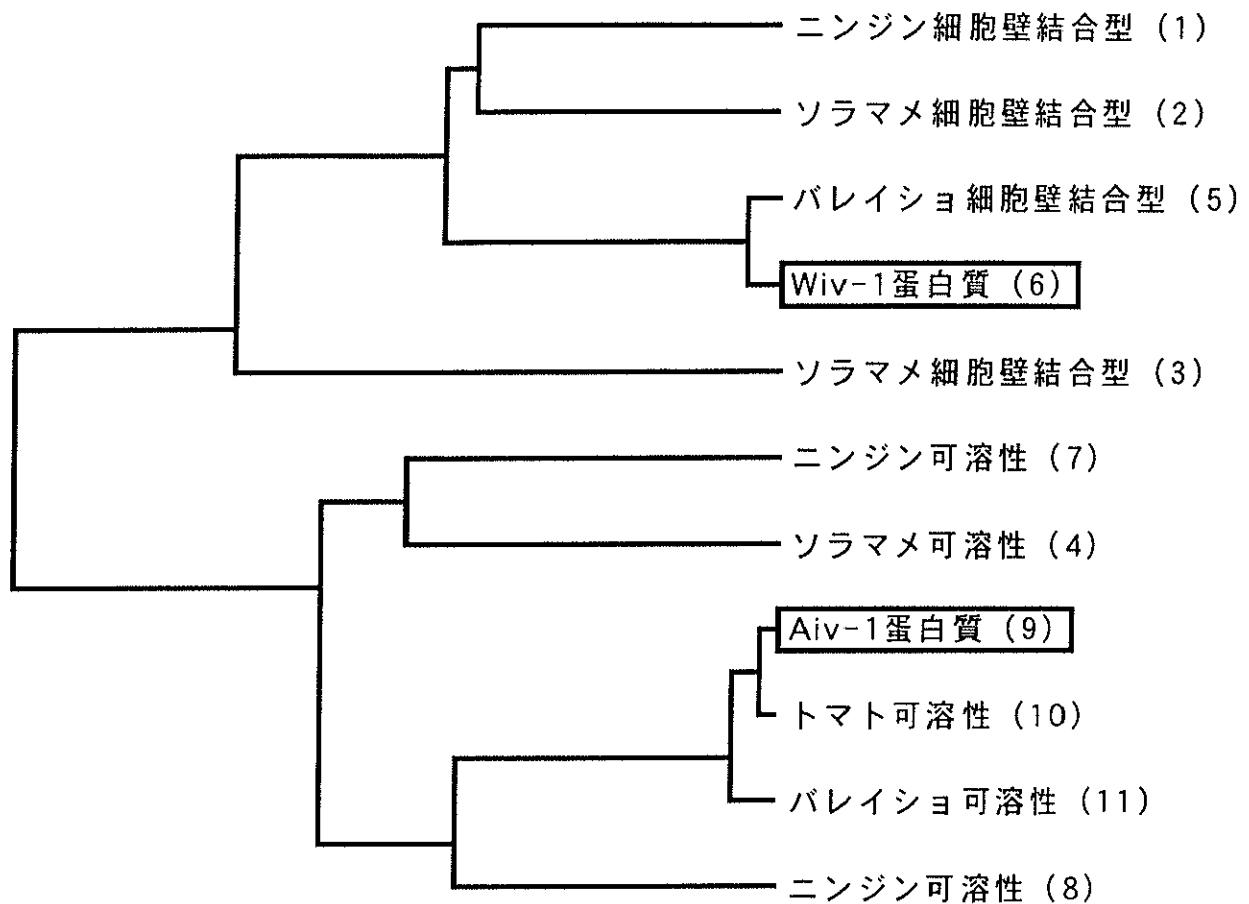


図4-1-2 植物酸性インペルターゼアミノ酸配列間の類似性を基に作成した系統樹

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。各種酸性インペ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, 3, 4), Z35162, Z35163, Z49831 (Weber et al., 1995); (5), Z22645 (Hedley et al., 1994); (6), Wiv-1蛋白質; (7, 8), X67163, X75352 (Unger et al., 1994); (9), Aiv-1蛋白質 (第2章); (10), M81081 (Klann et al., 1992); (11), L29099 (Zhou et al., 1994)

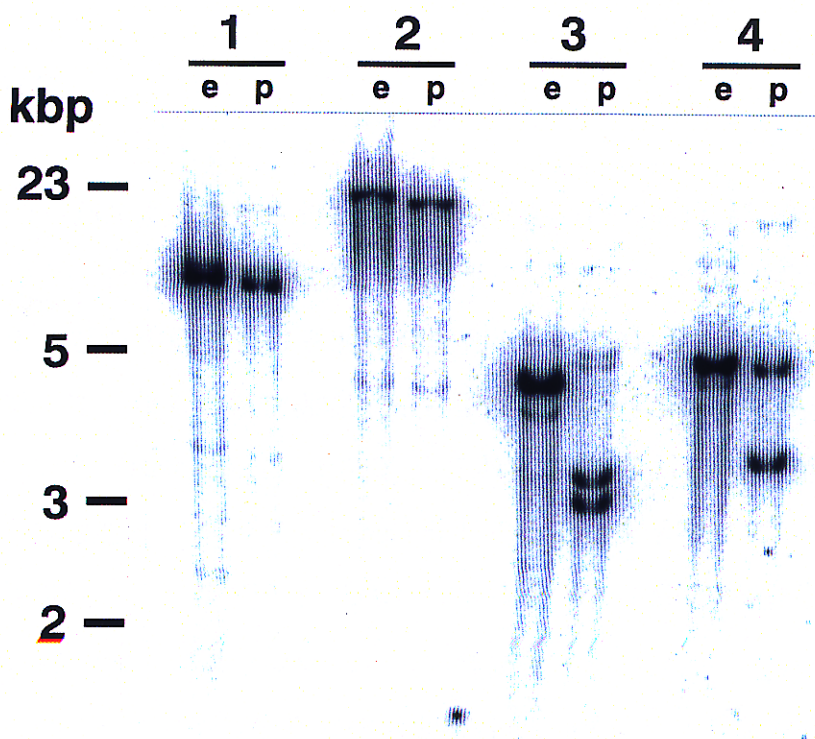


図4-1-3 Wiv-1 cDNAをプローブとしたサザン
プロット分析

トマト *L. esculentum* (e) および野生種 *L. peruvianum* (p) 由来のゲノムDNA (10 μ g/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³²Pで標識したWiv-1 cDNAとハイブリダイズさせた。

示す。ハイブリダイゼーションパターンは、細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA, Wiv-1 に対応する遺伝子の数が、何れの種においてもハプロイド当たり 1 ~2 個であることを明確に示していた。

4-1-3 考察

Wiv-1 cDNA より推定されたアミノ酸配列 (図 4-1-1) は、既知の可溶性酸性インベルターゼよりも細胞壁結合型酸性インベルターゼの方に類似していた (図 4-1-2)。活性中心付近の高度保存配列 (WECPD) および Wiv-1 蛋白質の塩基性の等電点は、種々の植物細胞壁結合型酸性インベルターゼの一般的な特徴と一致していた (Roitsch et al., 1995)。これらの結果は、Wiv-1 がトマト植物の細胞壁結合型酸性インベルターゼをコードすることを示唆している。また、トマト可溶性酸性インベルターゼ cDNA、Aiv-1 と Wiv-1 間の塩基配列レベルにおける類似性 (53.8%) が低い事実は、可溶性酸性インベルターゼに対するアンチセンス遺伝子により葉中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性が阻害を受けなかったという前章の結果 (図 3-2-2, 表 3-2-2) を反映するものと考えられる。なお、塩基配列は完全には一致しないが、Wiv-1 は最近 Godt and Roitsch (1997) により報告された細胞壁結合型酸性インベルターゼの部分遺伝子 *Lin6* cDNA と非常に高い類似性を有しており、これら 2 つの cDNA (mRNA) は同一遺伝子に由来するものと考えられる。

摘要

既知酸性インベルターゼのアミノ酸配列を基に作製した合成プライマー混合物を用いて PCR を行い、細胞壁結合型酸性インベルターゼの遺伝子断片を増幅した。この断片をプローブとして、トマトの傷害処理葉由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、完全なコード領域を含む cDNA, Wiv-1 を単離した。

Wiv-1 のコードする蛋白質は、塩基性の等電点を有し、種々の植物の細胞壁結合型酸性インベルターゼと高い類似性を示した。推定アミノ酸配列中には、植物の細胞壁結合型酸性インベルターゼで高度に保存された配列 (WECPD) が見いだされた。これらの結果は、Wiv-1 が細胞壁結合型酸性インベルターゼをコードすることを示唆している。