

第5章 生育中のトマトおよび傷害処理葉における可溶性、 細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子の発現様式

はじめに

第2章および第4章において単離した2種のトマト酸性インベルターゼ遺伝子の発現について解析した。

第1節では、傷害誘導処理をした栽培トマトおよび野生種の葉における2種の酸性インベルターゼ遺伝子 (*Aiv-1* および *Wiv-1*) の発現様式について調査した。第2節では、半定量的 RT-PCR を用いて、2種酸性インベルターゼ遺伝子のトマトおよび野生種間における発現レベルの差異等について調査した。

第1節 傷害処理中の葉における可溶性、細胞壁結合型 酸性インベルターゼ遺伝子の発現様式

第2章において単離した cDNA, Aiv-1 および第4章で単離した cDNA, Wiv-1 をプローブとして、傷害誘導処理をしたトマトおよび野生種の葉におけるこれら遺伝子の発現様式について調査し、2種の酸性インベルターゼ遺伝子間およびシンク・ソース葉間に見られた遺伝子発現の差異について考察を行った。

5-1-1 材料および方法

5-1-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」および野生種の成熟葉（ソース葉）あるいは未熟葉（シンク葉）を収穫し、第3章、第2節に従い傷害誘導処理をした。

5-1-1-2 酵素活性測定

傷害誘導処理前および処理後の葉の活性測定は、第1章、第1節に準じて行った。

5-1-1-3 ノーザンプロット分析

傷害誘導処理前および処理後の葉は、液体窒素中で磨砕後、-80℃で使用時まで保存した。ノーザンプロット分析は基本的に、第2章、第2節に記載の方法に準じて行った。プローブは、³²P でマルチプライム標識した Aiv-1 cDNA あるいは Wiv-1 cDNA を使用した。

5-1-2 結果

5-1-2-1 傷害処理葉における酸性インベルターゼ活性

傷害誘導処理により、トマトのシンクおよびソース葉、並びに野生種のソース葉における可溶性酸性インベルターゼ活性の上昇が認められた（図 5-1-1A）。トマトのソース葉における同酵素活性は、傷害処理の有無に関わらず、シンク葉中の活性を上回った（図 5-1-1A）。トマトと比較して、野生種のシンクあるいはソース葉における同酵素活性は、傷害処理後においても非常に低い値であった（図 5-1-1A）。野生種のシンク葉においては傷害誘導は認められなかった（図 5-1-1A）。

2種のトマト葉における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 5-1-1B）。トマト葉中の同酵素活性は、傷害処理の前後を通じて野生種の活性を上回っていた（図 5-1-1B）。傷害処理後のソース葉中の活性は、いずれの種においても傷害処理後のシンク葉中の活性を上回った（図 5-1-1B）。

5-1-2-2 傷害処理葉のノーザンプロット分析

第2章で単離した可溶性酸性インベルターゼ cDNA, Aiv-1 および第4章で単離した細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA, Wiv-1 をプローブとして、傷害処理葉におけるこれら遺伝子の発現について調査した。

トマトのソース葉中の Aiv-1 mRNA の存在量は、傷害処理後 48 時間で僅かに増大し、96 時間後には再び減少した（図 5-1-2）。また、トマト葉における Aiv-1 mRNA の存在量は、野生種よりも高く、また、ソース葉における同 mRNA 存在量は傷害処理後においてもシンク葉中の存在量を上回った（図 5-1-2）。

Wiv-1 プローブにより検出されたシグナルは、いずれの種においても、傷害処理前の葉において非常に低かった（図 5-1-2）。傷害処理により2種トマトのシンクおよびソース葉中の Wiv-1 mRNA の存在量は、Aiv-1 mRNA と比較して顕著に増大した（図 5-1-2）。トマトのソース葉中の Wiv-1 mRNA 存在量は、96 時間の傷害処理の間増大し続ける傾向を示した（図 5-1-2）。ソース葉におけ

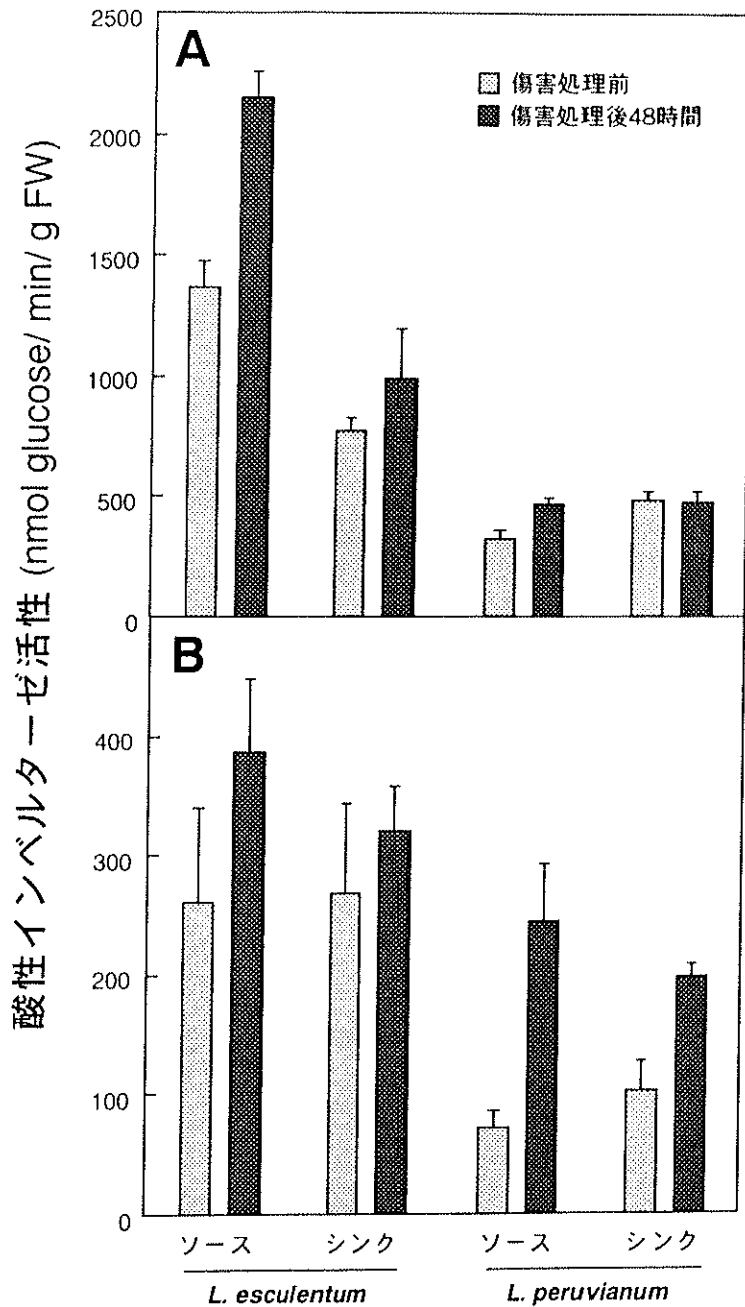


図5-1-1 傷害処理による可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の誘導

トマト (*L. esculentum*) および野生種 *L. peruvianum* の葉より切片を切り出し、暗黒下、25℃で48時間傷害処理を行った。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。

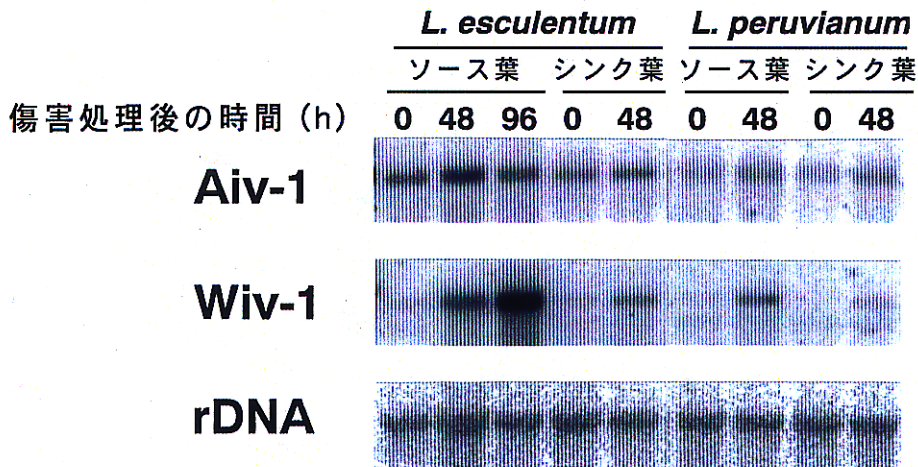


図5-1-2 酸性インベルターゼ遺伝子発現のノーザンプロット分析

各レーンには傷害処理葉より抽出した総RNA, 3 μ gを供試し、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 32 Pで標識したAiv-1 cDNAあるいはWiv-1 cDNAとハイブリダイズさせた。各レーンの総RNA量は、25S rDNAプローブで検出されたシグナルにより比較した。

る Wiv-1 mRNA の傷害誘導は、シンク葉よりも顕著であり、また、傷害処理の前後を通じて、トマト葉における mRNA 存在量が野生種葉中の存在量を上回った (図 5-1-2)。

5-1-3 考察

Godt and Roitsch (1997) は、4 種類の細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子 (*Lin5*, *Lin6*, *Lin7* および *Lin8*) がトマトゲノム中に存在し、そのうちの 1 つ *Lin6* 遺伝子、すなわち本論文における *Wiv-1* 遺伝子のみが傷害誘導性を有していると報告した。また、アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子の導入により、傷害処理中のトマト葉における可溶性酸性インベルターゼ活性の大部分が抑制されることを第 3 章で明らかにした (表 3-2-2, 図 3-2-2)。従って、傷害処理中の葉において誘導される可溶性および細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、それぞれ *Aiv-1* および *Wiv-1* mRNA の存在量を反映しうると考えた。

Aiv-1、*Wiv-1* mRNA の存在量および可溶性、細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、傷害処理により増大したが、2 種インベルターゼ間には傷害誘導パターンに顕著な違いが見いだされた (図 5-1-1, 5-1-2)。傷害に対する *Aiv-1* mRNA の誘導はあまり顕著ではなかった (図 5-1-2)。一方、*Wiv-1* mRNA の存在量は、傷害処理前の葉においては非常に低かったが、傷害処理により著しく増大した (図 5-1-2)。さらに、*Aiv-1* mRNA 存在量は、傷害処理後 48 時間で最大値に達したが (図 5-1-2)、*Wiv-1* mRNA 存在量は傷害処理後 96 時間の時点においても増大する傾向を示した (図 5-1-2)。これらの結果は、2 種のインベルターゼ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。加えて、傷害処理による 2 種の酸性インベルターゼ活性および mRNA 存在量の増大は、シンク葉よりもソース葉においてより顕著であった (図 5-1-1, 5-1-2)。この結果は、生長中の葉 (シンク葉) においては傷害に対する反応が十分に確立されていないことを示唆している。

第2節 生育中の植物体における可溶性、細胞壁結合型 酸性インベルターゼ遺伝子の発現様式

傷害誘導処理をしていない組織では、細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子 (*Wiv-1*) の発現が弱く、ノーザンブロット分析による mRNA 存在量の比較が困難である。本節では、生育中の2種トマト植物の各器官における *Wiv-1* および *Aiv-1* mRNA 存在量を検出感度の高い半定量的 RT-PCR により比較することを試みた。

5-2-1 材料および方法

5-2-1-1 植物材料

温室で栽培したトマト品種「ハウスおどりこ」および野生種の各器官、ならびに傷害誘導処理をした成熟葉 (ソース葉) と未熟葉 (シンク葉) を供した。

5-2-1-2 半定量的 RT-PCR

各器官からの総 RNA の抽出は、第2章、第1節に記載の方法に準じて行った。半定量的 RT-PCR は、Dallman and Porter (1991) および Hatfield et al. (1997) の方法に準じて行った。総 RNA は、逆転写反応に先立って、70°C で10分間保温した。その後、4 μ l の 5x first-strand buffer (Gibco BRL)、2 μ g の変性した総 RNA、100 ng oligo-(dT)₁₂₋₁₈、0.5 mM dNTPs、10 mM DTT、1 μ l の RNase インヒビター (RNA guard™; ファルマシアバイオテック社)、1 μ l の Superscript reverse transcriptase (Gibco BRL) を含む総量 20 μ l の第1鎖合成反応液を調整し、37°C で1時間、次いで 95°C で5分間保温した。第1鎖合成反応終了後、反応液から 1、0.1 あるいは 0.01 μ l をとり、特異的プライマー [可溶性酸性インベルターゼ

cDNA ; 5'-AGGACTTTAGAGACCCGA-3' (4141 プライマー) および 5'-GTCAGCAGATTCAGTCTGTC-3' (4131C プライマー)、細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA ; 5'-TCGAACCCGCTATCTACCCGTC-3' (EWI-1 プライマー) および 5'-AGTATCCATCTCTGCCCATCCAAG-3' (EWI-4R プライマー)]の存在下、20 µl の反応系で PCR を行った。PCR の条件は、95 °C、20 秒間 ; 55 °C、30 秒間 ; 72 °C、1 分間 ; 20 回とした。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで分離後、第 2 章、第 2 節の方法に従いナイロン膜 (Hybond N+, アマシャム社) に転写し、ハイブリダイゼーションを行った。プローブは、Aiv-1 cDNA を鋳型とし、4141 および 4131C プライマーと共に上記条件で増幅された PCR 産物、あるいは Wiv-1 cDNA を鋳型とし、EWI-1 および EWI-4R プライマー存在下で増幅された PCR 産物を ³²P でマルチプライム標識したものを使用した。

5-2-2 結果

5-2-2-1 トマト植物体および傷害処理葉の半定量的 RT-PCR 分析

野生種果実における Aiv-1 mRNA の存在量は、分析した全てのステージにおいてトマト果実中の mRNA 存在量を下回った (図 5-2-1)。Wiv-1 mRNA は、何れの種の果実においても殆ど検出されなかった (図 5-2-1)。野生種のシンク葉、ソース葉、根、若い茎、および花における 2 種の酸性インベルターゼ mRNA の存在量は、トマトにおける各器官中のレベルとほぼ同じか、あるいは下回っていた (図 5-2-1)。また、何れのトマトにおいても、Aiv-1 mRNA は葉と花、Wiv-1 mRNA は葉と若い茎で比較的高い存在量を示した (図 5-2-1)。

5-2-3 考察

第 1、2 章で示したように、トマト果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性および mRNA は、成熟と共に著しく増大する (図 1-1-2, 2-2-1)。一方、野

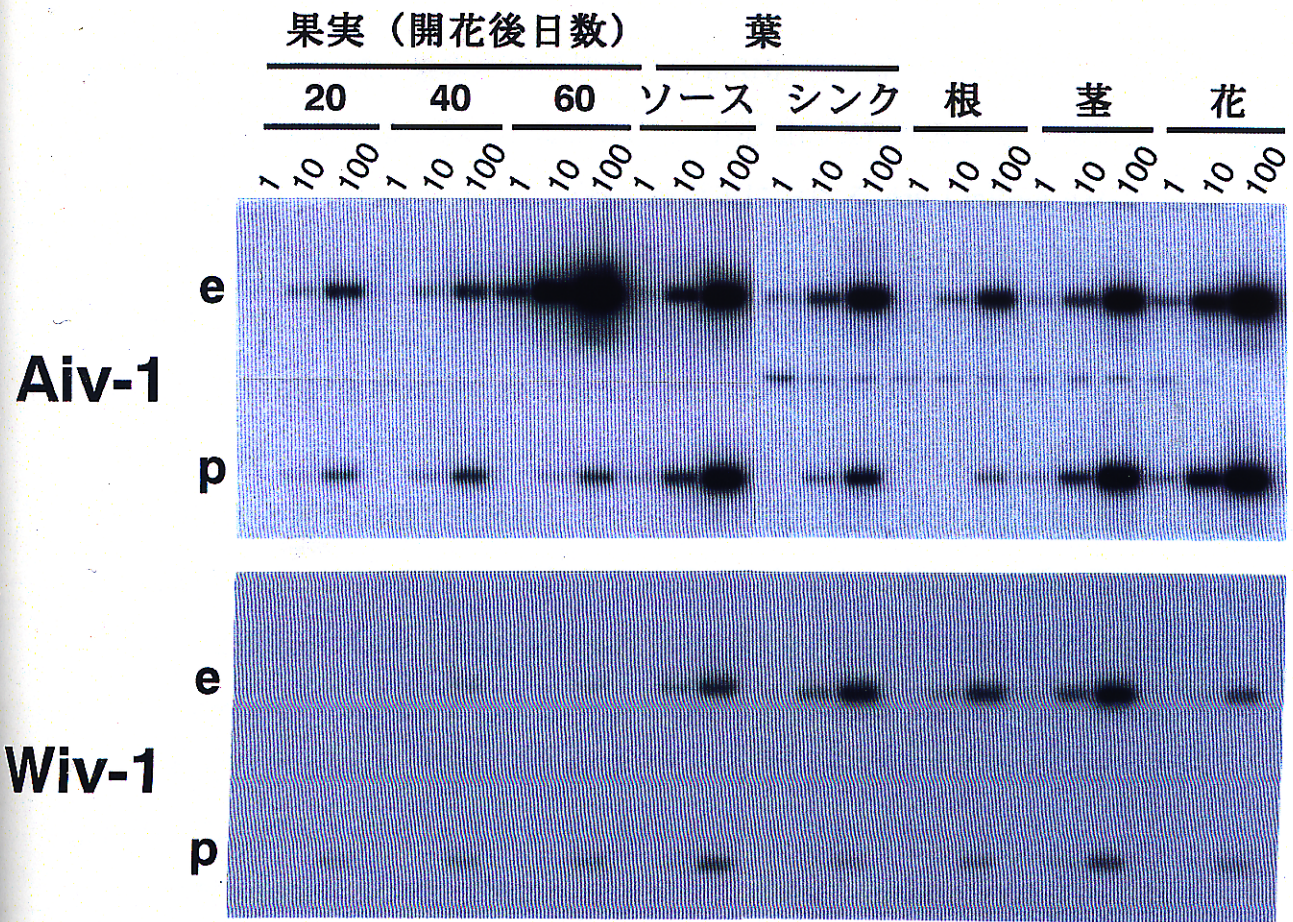


図5-2-1 トマト (*L. esculentum*) および野生種 *L. peruvianum* の各器官由来の一本鎖cDNAを用いた半定量的RT-PCR分析

トマト (e) あるいは野生種 (p) の各組織由来の総RNAより一本鎖cDNAを合成した。一本鎖cDNA合成反応液より 0.01 μ l (1)、0.1 μ l (10) あるいは 1 μ l (100) をPCR反応に供した。PCR産物は、1.5%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、³²Pで標識したプローブとハイブリダイズさせた。4141および4131Cプライマーで増幅されたPCR産物 (Aiv-1 cDNA 5'断片、約480 bp) は、Aiv-1 cDNAより同じプライマーを用いて増幅された断片をプローブとして検出した。EWI-1およびEWI-4Rプライマーにより増幅されたPCR産物は (Wiv-1 cDNA 5'断片、約280 bp)、Wiv-1 cDNAより同じプライマーを用いて増幅された断片をプローブとして検出した。

生種果実においては、果実中の活性および mRNA 存在量が発育期間中、非常に低いレベルで推移する（図 1-1-2, 2-2-1）。半定量的 RT-PCR により検出された開花後 20~60 日後のトマトおよび野生種果実における Aiv-1 mRNA の存在量の差異（図 5-2-1）は、第 2 章におけるノーザンブロット分析の結果（図 2-2-1）を良く反映していた。また、トマトの葉における Aiv-1 mRNA 存在量は、果実ほど顕著ではないが野生種葉中の存在量を上回った（図 5-2-1）。さらに、生育中の植物の根、茎、および花についても同様の種間差異が認められた（図 5-2-1）。Aiv-1 mRNA と同様の種間差異は、根、茎および葉における Wiv-1 mRNA 存在量にも認められた（図 5-2-1）。これらの結果は、トマトにおける 2 種の酸性インベルターゼ遺伝子（*Aiv-1* および *Wiv-1*）の発現が、野生種中の発現よりも強いことを示唆している。Aiv-1 および Wiv-1 mRNA の存在量に認められる種間差異が、それぞれの mRNA に対応する酸性インベルターゼ遺伝子のコピー数の違いに起因するとは考えにくい（第 2 章、図 2-2-2 および第 4 章、図 4-1-3）。トマトおよび野生種間における 2 種の酸性インベルターゼ mRNA の存在量の差異を解明するためには、各インベルターゼ遺伝子のプロモーター領域の解析も必須であろう。

摘要

第2章および第4章において単離した2種の酸性インベルターゼ遺伝子の発現について解析した。

1) 傷害処理葉における可溶性酸性インベルターゼ mRNA (Aiv-1 mRNA) の誘導は強くはなかったが、細胞壁結合型酵素 mRNA (Wiv-1 mRNA) の誘導は顕著であった。Aiv-1 mRNA の存在量は、傷害処理後 48 時間で最大値に達したが、Wiv-1 mRNA の存在量は、傷害処理後 96 時間の時点においても増大する傾向を示した。これらの結果は、2種の酸性インベルターゼ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。

2) トマトの種々の器官における Aiv-1 および Wiv-1 mRNA の存在量は、野生種における存在量を上回った。ハプロイドあたりの遺伝子コピー数は、いずれの酸性インベルターゼ遺伝子についても種間で違いは認められないことから、これら mRNA 存在量の種間差異は、それぞれの種の遺伝子プロモーター部により制御されている可能性が考えられる。