

## 第6章 細胞壁結合型酸性インベルターゼアンチセンス遺伝子 導入による細胞壁結合型酸性インベルターゼの生理的 機能の推定

### はじめに

トマトの果実、葉における細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、可溶性酸性インベルターゼに比べて極めて低い（表 1-1-2、図 1-1-2）。それゆえ、*Lycopersicon* 属植物の細胞壁結合型酸性インベルターゼに関する基礎的な知見は、遺伝子の有無をはじめとして、今まで殆ど得られてはいなかった。最近、トマトから細胞壁酸性インベルターゼ遺伝子 (cDNA) がようやく単離され (Godt and Roitsch, 1997; および第 4 章参照)、同酵素機能の生理学的解析も行われつつある (Dali et al., 1992; Ruan and Patrick, 1995; Ho, 1996; Ruan et al., 1996; Brown et al., 1997)。しかし、Reverse genetics の手法を用いて酵素機能を直接証明する研究は報告されていない。また、依然としてトマトにおいては果実を対象とした研究が主流であり、葉や茎等の他器官における細胞壁結合型酵素の機能については殆ど不明なのが現状である。

本章は、第 4 章において単離した細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA, *Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子を作製し、トマトに導入することにより、*Wiv-1* 遺伝子産物（細胞壁結合型酸性インベルターゼ）の機能推定を試みたものである。

本章の構成は、第 3 章に準ずる。第 1 節においてはアンチセンス遺伝子の構築、形質転換トマトの作出を行い、第 2 節においては形質転換トマトの細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性および mRNA 存在量を調査し、アンチセンス遺伝子の効果について検証した。第 3 節では形質転換トマトの稔性および成熟葉（ソース葉）中の炭水化物量について調査し、*Wiv-1* 遺伝子産物（細胞壁結合型酸性インベルターゼ）の機能について考察した。

## 第1節 細胞壁結合型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

アンチセンス遺伝子の作製、導入は、ほぼ第3章、第1節に準じて行った。得られた再分化植物は、PCR およびサザンブロット分析により導入遺伝子の有無を確認した。

### 6-1-1 材料および方法

#### 6-1-1-1 アンチセンス遺伝子導入用ベクター (pBWI-2) の構築

第4章において Wiv-1 と共に単離された細胞壁結合型酸性インベルターゼ cDNA, Wiv-2 (partial Wiv-1) をベクターの構築に使用した。Wiv-2 は、Wiv-1 の 483 番目の塩基から 3' 端下流 37 bp までの配列を含む約 1.4 kbp の不完全長 cDNA である。バイナリーベクター pBI 121 (Clontech Laboratories, Inc., USA) を制限酵素 *Sma* I と *Sac* I で消化し、 $\beta$ -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 *Hinc* II、*Sac* I により切り出された cDNA, Wiv-2 を連結し、ベクター pBWI-2 を作製した (図 6-1-1)。

#### 6-1-1-2 *Agrobacterium* を用いたトマトの形質転換

トマト品種「秋玉」の形質転換は、第3章、第1節に記載の方法に準じて行った。

#### 6-1-1-3 PCR による導入遺伝子の確認

再分化植物からの DNA の抽出は、Murray and Thompson (1980) の方法に従った。PCR は、図 6-1-1 に示した箇所の塩基配列に対応する 2 種のプライマー [5'-AGTATCCATCTCTGCCCATCCAAG-3' (EWI-4R プライマー) および 5'-

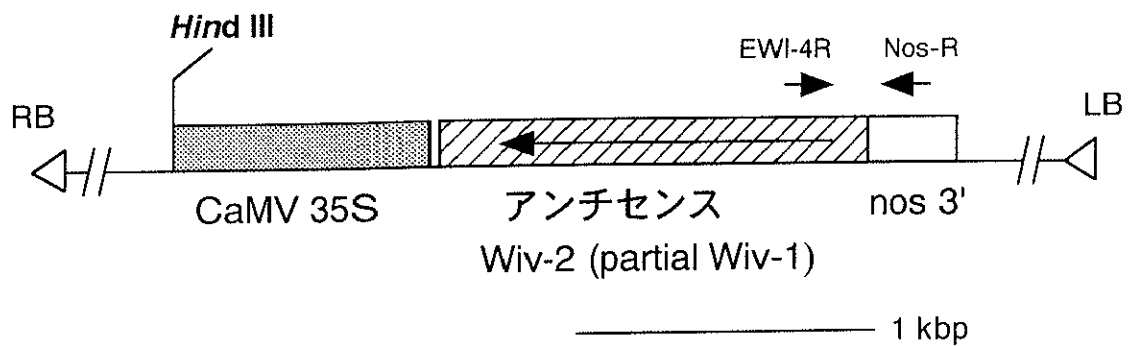


図6-1-1 バイナリーベクターpBWI-2の構造

アンチセンス遺伝子（アンチセンスWiv-2）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。図に示した以外の箇所構造は、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。導入遺伝子の検出（図6-1-3）に用いたプライマーは、矢印の箇所の塩基配列に対応する（EWI-4RおよびNos-R）。

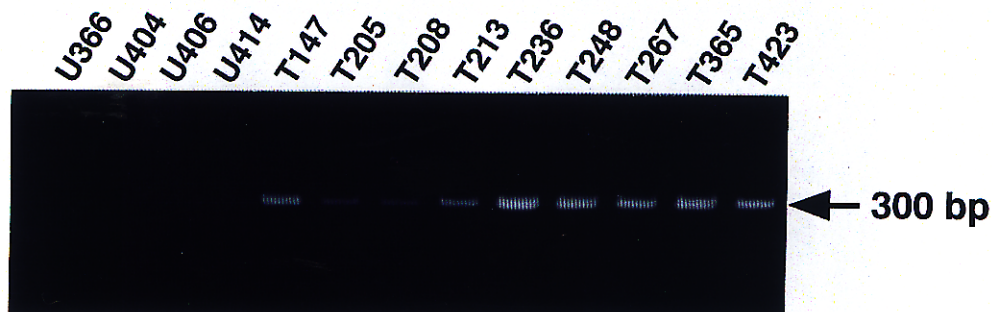
ATCATCGCAAGACCGGCAAC-3' (Nos-R プライマー)] および Ex *Taq* polymerase (Takara 社) を用いて行った。PCR の条件は、94 °C、1 分 ; 55 °C、1 分 ; 72 °C、1 分 ; 25 回とした。PCR 産物は、0.5µg/ml の臭化エチジウムを含む 2 % アガロースゲル電気泳動により分析した。

#### 6-1-1-4 サザンプロット分析

サザンプロット分析は、第 3 章、第 1 節の方法に準じて行った。ゲノム DNA (10µg/レーン) の消化には、制限酵素 *Hind* III を使用した。プローブには、<sup>32</sup>P でマルチプライム標識した cDNA, *Wiv-2* (図 6-1-1) を使用した。

#### 6-1-2 結果および考察

再分化植物ゲノム中の導入遺伝子の確認は PCR により行った。供試した 13 個体のうち 9 個体 (T147, T205, T208, T213, T236, T248, T267, T365, T423) について、アンチセンス遺伝子に由来する約 300bp のバンドが確認された (図 6-1-1, 6-1-2)。導入遺伝子が確認されなかった 4 個体 (U366, U404, U406, U414) は、非形質転換トマト (対照) として以後の実験に使用した。得られた 9 個体の形質転換トマトについてサザンプロット分析を行い、導入遺伝子のコピー数を調査した (図 6-1-3)。非形質転換トマト (U 植物) を始め、全ての植物体に観察される約 5 kbp のバンドは、内在 *Wiv-1* 遺伝子に由来する。5 kbp 以外のバンドは、ベクター pBWI-2 上の *Hind* III サイトの下流、すなわち CaMV 35S から下流 left border (LB) までの T-DNA、および LB に隣接するトマトのゲノム遺伝子で構成されるキメラ断片に由来するものである。従って、5 kbp 以外のバンドの数は、導入遺伝子のコピー数に相当すると考えられる (図 6-1-3 および第 3 章、第 1 節を参照)。また、あるバンドの長さが、CaMV 35S から nos 3' までの約 2.5 kbp を上回るならば、そのバンドに対応する導入遺伝子中には完全なアンチセンス遺伝子が 1 コピー含まれるものと考えられる。以上の基準により計測した各



### 図6-1-2 PCRによるアンチセンス遺伝子の検出

再分化個体より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、EWI-4RおよびNos-Rプライマー（図6-1-2）存在下でPCRを行った。PCR産物は2%アガロースゲルで分離し、0.5 $\mu$ g/mlの臭化エチジウムにより染色した。検出された約300bpのアンチセンス遺伝子断片は矢印で示す。  
 U: 非形質転換体, T: 形質転換体

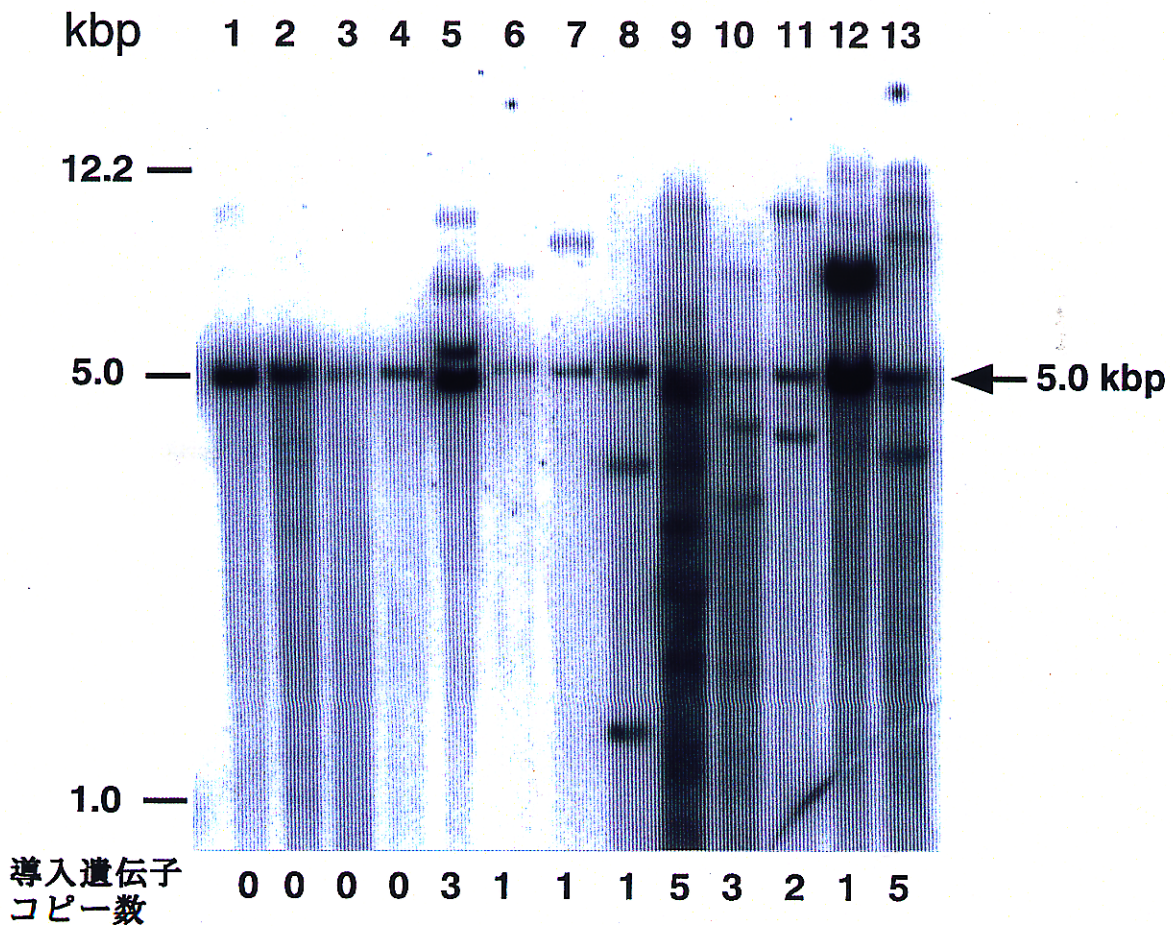


図6-1-3 サザンプロット分析によるアンチセンス遺伝子  
コピー数の測定

形質転換トマト (T植物) および対照の非形質転換トマト (U植  
物) のゲノムDNA (10 $\mu$ g/レーン) を制限酵素 *Hind* III 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。  
ナイロン膜は<sup>32</sup>Pで標識した *Wiv-2* cDNA (図6-1-1) とハイブリダ  
イズさせた。形質転換体および非形質転換体間で共通して認めら  
れる約5kbpのバンド (矢印) は、内在遺伝子 (*Wiv-1* 遺伝子) に由  
来するものである。1: U366, 2: U404, 3: U406, 4: U414, 5: T147, 6:  
T205, 7: T208, 8: T213, 9: T236, 10: T248, 11: T267, 12: T365, 13: T423

形質転換トマトの完全なアンチセンス遺伝子のコピー数は、T147, 3 コピー; T205, 1 コピー; T208, 1 コピー; T213, 1 コピー; T236, 5 コピー; T248, 3 コピー; T267, 2 コピー; T365, 1 コピー; T423, 5 コピーであった。なお、T213 は 2 コピーの導入遺伝子を含んでいたが、1 コピーについては導入遺伝子に由来するバンドの長さが 2.5 kbp 未満であったため、完全なアンチセンス遺伝子ではないと考えられた (図 6-1-3)。

## 第2節 形質転換トマトの傷害処理葉におけるアンチセンス 遺伝子の発現

第1節で作出した形質転換トマトの葉における細胞壁結合型酸性インベルターゼの mRNA レベル、酵素活性について調査し、アンチセンス遺伝子発現による内在遺伝子発現の阻害を確認した。

### 6-2-1 材料および方法

#### 6-2-1-1 植物材料

第1節において作出した形質転換トマト (T147, T205, T208, T213, T236, T248, T267, T365, T423) および対照の非形質転換トマト (U366, U404, U406, U414) を野菜茶試の閉鎖系温室で栽培した。各個体から収穫した成熟葉を直ちに以下の実験に使用した。

#### 6-2-1-2 傷害誘導および酵素活性測定

成熟葉は96時間傷害処理(第3章、第2節参照)後、第1章、第1節に記載の方法に従い細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性を測定した。

#### 6-2-1-3 ノーザンプロット分析

傷害処理葉からの総 RNA の抽出およびノーザンプロット分析は、第2章、第1節の記載に従い行った。プローブは、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 (約 280bp、第5章、第2節参照) を <sup>32</sup>P でマルチプライム標識したものを使用した。



## 6-2-2 結果および考察

生育中のトマトの成熟葉における細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性は非常に低いため（第1章、表1-1-2および第5章、図5-1-1B）、96時間傷害処理した成熟葉を用いてアンチセンス遺伝子による活性抑制効果を検証した（図6-2-1）。形質転換トマトの傷害処理葉における細胞壁結合型酵素活性は、個体間でかなりの差異が認められ、活性が対照と同程度のもの（T147, 205, 208, 213, 267, 365）から、活性が対照の値よりも減少していたもの（T236, 248, 423）まで、様々な活性レベルを有する個体が存在していた（図6-2-1）。活性の減少の認められた3個体のうち、T248, T423については、対照の非形質転換トマト（4個体の平均値）との間に有意な差が認められた（図6-2-1）。

96時間傷害誘導処理を行った成熟葉のノーザンブロット分析の結果を図6-2-2に示す。形質転換トマトの傷害処理葉における Wiv-1 mRNA 存在量は、対照の非形質転換トマト（U406）と比較して減少していた（図6-2-2）。この結果は、導入したアンチセンス遺伝子（図6-1-1）の発現により内在 Wiv-1 mRNA 存在量が減少したことを示すものと考えられる。アンチセンス遺伝子のコピー数と Wiv-1 mRNA 存在量との間に相関は認められなかったが（図6-1-3, 6-2-2）、この結果は、各形質転換トマトの Wiv-1 mRNA 存在量が、コピー数以外の他の要因、例えば、アンチセンス遺伝子の挿入位置等により影響を受けることを示しているのかもしれない。

なお、各形質転換トマトの傷害処理葉中の Wiv-1 mRNA 存在量は、活性レベルを必ずしも反映してはいなかった（図6-2-1, 6-2-2）。特に、一部の個体（T205, T365）については、活性の減少が殆ど認められないのにも関わらず、Wiv-1 mRNA の顕著な減少が観察された（図6-2-1, 6-2-2）。この原因については今のところ不明である。傷害処理葉における活性、Wiv-1 mRNA 存在量の経時的变化、さらには他の細胞壁結合型酸性インペルターゼ遺伝子（Godt and Roitsch, 1997）の発現状況等の調査により、今後解明していく必要があると思われる。

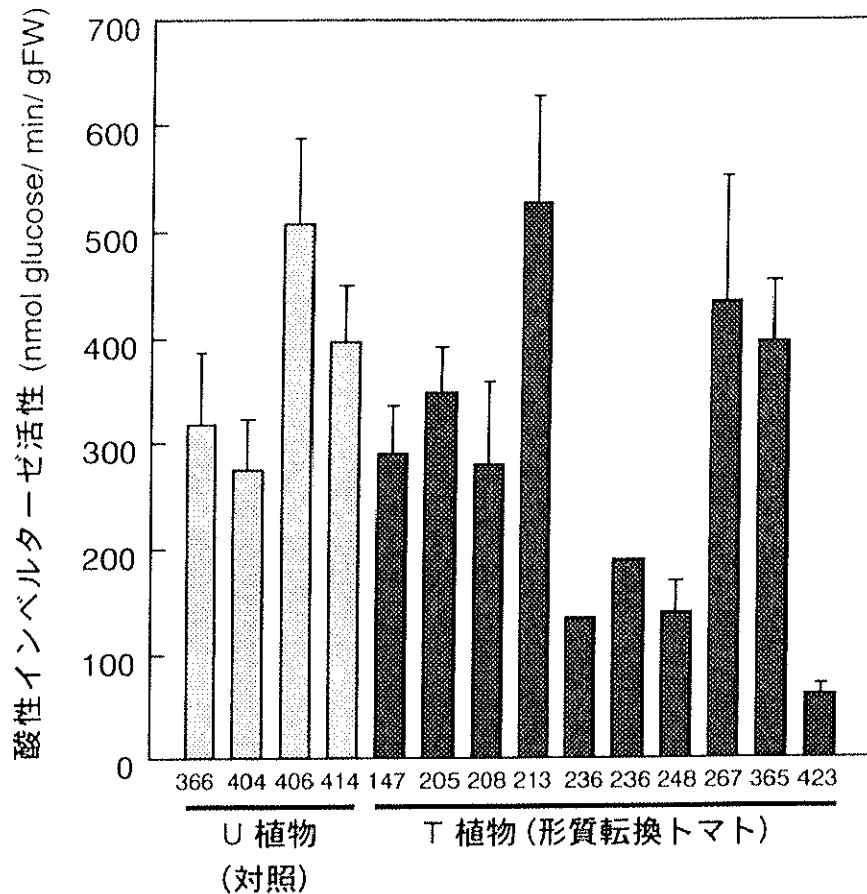
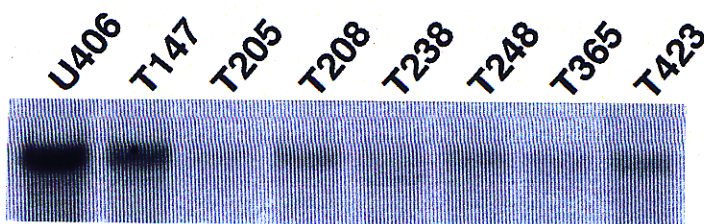


図6-2-1 形質転換トマトの傷害処理葉中の細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性

非形質転換トマト (U植物、対照) とpBWI-2形質転換トマト (T植物) の成熟葉の切片を暗黒下25℃で96時間傷害処理した。96時間の傷害処理後、葉切片中の細胞壁結合型酸性インペ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 (T236については2反復の試験結果の併記)。



#### 図6-2-2 形質転換トマトの傷害処理葉のノーザン プロット分析

各レーンには、96時間傷害処理した成熟葉より抽出した総RNA, 6 $\mu$ 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Wiv-1 cDNAの5'断片とハイブリダイズさせた。

### 第3節 アンチセンス遺伝子を導入したトマトの葉中の 炭水化物量測定および遺伝子導入トマトの特性調査

アンチセンス遺伝子 (pBWI-2) 導入トマトの成熟葉の糖含量および特性を調査し、シンク器官 (花器、花粉) およびソース器官 (成熟葉) におけ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、トマト植物における細胞壁結合型酸性インベルターゼの機能について考察した。

#### 6-3-1 材料および方法

##### 6-3-1-1 植物材料

第1節において作出した形質転換トマト (T147, T205, T208, T213, T236, T248, T267, T365, T423) および対照の非形質転換トマト (U366, U404, U406, U414) を野菜茶試の閉鎖系温室で栽培し、以下の実験に使用した。

##### 6-3-1-2 糖含量測定

形質転換トマトおよび非形質転換トマトの成熟葉 (ソース葉) を、正午頃に採取し (1997年、7~9月)、分析に供した。可溶性糖類の含量は、第1章、第1節に準じて測定した。

##### 6-3-1-3 澱粉量測定

上記可溶性糖類の抽出、遠心後、得られた沈殿は、600 $\mu$ l の DMSO で可溶化し、150 $\mu$ l の塩酸を加え、60 $^{\circ}$ C で 30 分間振盪した。5 規定 NaOH で pH を 4~5 に調整した後、3ml に定容し、そのうち 100 $\mu$ l を澱粉量測定に使用した (F-kit starch、ベーリンガー社)。

#### 6-3-1-4 花粉の分析

形質転換トマトおよび非形質転換トマトより花粉を採集し、酢酸カーミンで染色した。濃く染色された花粉の割合を花粉稔性とした。

### 6-3-2 結果

#### 6-3-2-1 アンチセンス遺伝子導入トマトの成熟葉中の炭水化物量

傷害処理葉中の細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性の減少した3個体の形質転換トマト (T236, 248, 423) について成熟葉中の炭水化物量を調査した。形質転換トマト3個体の各炭水化物量の平均値は、対照の非形質転換トマト4個体 (U366, 404, 406, 414) の平均値の20~60%程度であった (表 6-3-1)。

#### 6-3-2-2 アンチセンス遺伝子導入トマトの特性

閉鎖系温室中の形質転換トマト (T植物) の殆どは、非形質転換トマトとほぼ同じ生育を示したが、T248のみは矮化していた (図 6-3-1)。また、形質転換トマトには着果が悪い個体が多数認められた (図 6-3-1、表 6-3-2)。

形質転換トマトの花粉稔性については、かなりの個体 (T147, T205, T208, T236, T248, T365, T423) で対照の値を下回った (表 6-3-2)。

### 6-3-3 考察

#### 6-3-3-1 成熟葉における細胞壁結合型酸性インペルターゼの機能について

傷害処理葉における細胞壁結合型酸性インペルターゼ活性が減少していた形質転換トマト3個体の成熟葉 (ソース葉) 中の各炭水化物量は、非形質転換トマトと比較して明らかに減少していた (表 6-3-1)。トマトあるいはタバ

表 6-3-1 形質転換トマトおよび非形質転換トマトの成熟葉中の炭水化物量の比較 (非形質転換トマト: n=4, 形質転換トマト: n=3)

	含量 (mg (g FW) <sup>-1</sup> )	
	非形質転換トマト	形質転換トマト (%)
ショ糖	0.82±0.26	0.17±0.02 (20.7)
ブドウ糖	0.79±0.15	0.23±0.05* (29.1)
果糖	2.83±0.35	1.67±0.15 (59.0)
全可溶性糖類	4.43±0.73	2.07±0.19 (46.7)
澱粉	14.5±3.61	5.24±2.31 (36.1)
全炭水化物	18.9±4.03	7.30±2.43 (38.6)

データは3あるいは4個体の平均値および標準誤差で示す。括弧内%は非形質転換トマトの値を100とした時の比率を表す。

\*: 5%水準で有意 (Student の t-検定)





図6-3-1 アンチセンス遺伝子 (pBWI-2) を導入したトマトの生育

A : 非形質転換トマト (U414)    B : pBWI-2により形質転換されたトマト (T236)    C : pBWI-2により形質転換されたトマト (T248)    D : pBWI-2により形質転換されたトマト (T423)

表 6-3-2 形質転換トマトの花粉稔性および着果状況

個体	花粉稔性 (%) <sup>1</sup>		着果
	1 回目	2 回目	
U366* (対照)	81.7	84.1	+++
U404* (対照)	87.3	82.6	+++
U406* (対照)	67.6	69.3	+++
U414* (対照)	86.0	N.D.	+++
T147	34.4	6.58	—
T205	27.9	8.47	±
T208	56.5	6.56	—
T213	79.4	83.1	±
T236	69.4	40.5	—
T248**	40.1	N.D.	±
T267	76.8	N.D.	++
T365	20.9	13.5	+
T423	1.10	0.00	—

花粉稔性は 2 反復の試験結果を併記した。

1: 酢酸カーミンで濃く染色された花粉の比率を表す。

\*: 非形質転換トマト \*\*: 植物体矮化 N.D.: 未検定



コ植物のアポプラスト部における酵母インベルターゼ遺伝子の過剰発現時には、葉中の炭水化物量の増大（転流阻害）、光合成活性の低下が観察されている

（Dickinson et al., 1991; Sonnewald et al., 1991）。従って、上記3個体の形質転換トマトで観察された結果は、細胞壁結合型酸性インベルターゼがソース葉中の炭水化物量の変動に関与する可能性を示すものと考えられた。さらに、形質転換トマトの成熟葉中の炭水化物のうち、ショ糖含量の減少が顕著であった事実（表 6-3-1）は、細胞壁結合型酵素活性の減少により葉肉細胞から篩部伴細胞へのショ糖のアポプラスト輸送（転流）が促進された可能性を示している。

### 6-3-3-2 花器における細胞壁結合型酸性インベルターゼの機能について

アンチセンス *Wiv-2* 遺伝子を導入したトマトの花粉稔性あるいは着果率については、多くの個体で低下が認められ（図 6-3-1、表 6-3-2）、特に花粉稔性および着果の極端に悪い T423 は、不稔個体と考えられた（表 6-3-2）。非形質転換トマトの花粉稔性および着果は概ね正常であったことから（表 6-3-2）、形質転換トマトで認められた稔性の低下（表 6-3-2）は、培養変異によるものではなく、アンチセンス遺伝子導入に伴う *Wiv-1* 遺伝子の発現阻害によって起こった可能性がある。これまでも多くの研究者によって、突然変異体等を用いた解析から、細胞壁結合型酸性インベルターゼのシンク能、unloading への関与が示唆されている（Ruan and Patrick, 1995; Weber et al., 1995, 1996; Cheng et al., 1996）。また、トマトの小花芽中には、*Wiv-1* (*Lin6*) mRNA 存在量が多いことが報告されている（Godt and Roitsch, 1997）。従って、今回、形質転換トマトで観察された結果は、*Wiv-1* mRNA にコードされる細胞壁結合型酸性インベルターゼが、トマトの花器官形成期におけるシンク代謝（unloading 等）にも影響を与えた可能性を示すものと考えられた。

## 摘要

細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子 *Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子を作製し、トマトに導入した。PCR およびサザンブロット分析により導入遺伝子の確認された 9 個体についてその特性を調査した。

1) アンチセンス遺伝子導入トマトの傷害処理葉における *Wiv-1* mRNA 存在量は、対照の非形質転換トマトと比較して減少していた。供試した 9 個体の形質転換トマトのうち、3 個体において傷害処理葉中の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の減少が認められた。

2) 傷害処理葉の細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性が減少した形質転換トマト 3 個体の成熟葉（ソース葉）中の炭水化物量を測定した。これら個体のソース葉中の炭水化物量は、非形質転換トマトよりも減少していた。この結果は、細胞壁結合型酵素が、ソース葉中の炭水化物量の制御に関わることを示唆している。

3) 形質転換トマトの多くで、花粉稔性の低下や着果数の減少が認められた。この結果は、*Wiv-1* mRNA にコードされる細胞壁結合型酸性インベルターゼが、花器官形成期におけるシンク代謝にも関与する可能性を示している。