

## 第7章 総合考察

本研究は、トマトの酸性インベルターゼの生理的機能を分子生物学的手法を用いて解析したものである。

植物インベルターゼには細胞内局在性等の異なる複数のアイソザイムの存在が知られている (Sturm and Chrispeels, 1990; Godt and Roitsch, 1997)。しかし、トマトにおけるアイソザイムの発現状況、存在比等についての解析例は極めて限られていた。シンク・ソース器官におけるインベルターゼアイソザイムの発現状況は、各アイソザイムの機能および糖代謝機構を解析する上での基礎的知見になると考えられる。そこで、可溶性酸性インベルターゼ遺伝子の RNA および Reverse genetics 分析により得られた結果を中心に、トマトの葉および果実における酸性インベルターゼの発現についてまず考察した。

Reverse genetics は非常に強力な酵素機能解析手段である。アンチセンス遺伝子導入に伴い内在遺伝子発現が減少した植物体を解析することにより、幾つかの代謝・生理的機能を推定し、また過去の仮説を検証することが可能となった。作物の生産性等を考える上でシンク・ソース器官における糖代謝機構を把握することは将来的にも重要である。そこで、本研究で解明された2種の酸性インベルターゼに関する機能について考察、展望した。

### 7-1 トマトの果実および葉における酸性インベルターゼの発現について

トマトの赤熟果実においては、非常に高いレベルの可溶性酸性インベルターゼ活性が観察されたが (図 1-1-2)、精製時あるいは精製後において可溶性酸性インベルターゼの isoform は検出されていない (図 1-2-2)。また、本実験において単離した可溶性酸性インベルターゼ cDNA, Aiv-1 は、イントロン由来の挿入配列を含んでいる以外は、先に Klann et al. (1992) が単離した cDNA, TIV1 と塩基配列が完全に一致することから (図 2-1-3)、2つの cDNA は同一遺伝子

の mRNA に由来するものと推定される。これらの結果およびアンチセンス *Aiv-1* 遺伝子の導入により果実可溶性画分の酵素活性が 99%以上抑制された事実(表 3-2-1) を総合すると、トマト果実中の可溶性酸性インベルターゼの殆どは、*Aiv-1* (あるいは *TIVI*) mRNA をコードする単一遺伝子に由来するものと考えることができる。Sun et al. (1992) は、果実の生長に伴う中性あるいはアルカリ性インベルターゼ活性の上昇を認めており、本報の予備試験時においても同様の現象が観察されている。しかし、上記アンチセンス遺伝子導入トマトの赤熟果実においては、弱アルカリ側 pH におけるインベルターゼ活性が 90%以上減少していることから(表 3-3-4)、報告されている中性あるいはアルカリ性インベルターゼ活性 (Sun et al., 1992) の殆どが酸性インベルターゼに由来しており、かつ赤熟果実中においては中性あるいはアルカリ性インベルターゼ活性が殆ど存在しないことが示唆される。細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性は、分析した果実発育ステージの全てにおいて可溶性酸性インベルターゼ活性よりもはるかに低いことから(図 1-1-2)、発育中、特に成熟期の果実におけるインベルターゼ活性の大部分は可溶性酸性インベルターゼに起因するものと考えられる。トマト果実は成熟に伴い液胞の肥大が著しくなる(金山・山木, 1993)。可溶性酸性インベルターゼはこの中に局在し(Konno et al., 1993)、主に原形質連絡を介して輸送された(Damon et al., 1988; Dali et al., 1992) ショ糖の分解に関わるものと考えられる。

トマトの成熟葉における可溶性酸性インベルターゼ活性は、アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子により約 80%の活性が消失した(表 3-2-2)。従って、トマト葉の可溶性酸性インベルターゼの大部分は、*Aiv-1* に由来するものと考えられる。なお、アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子導入トマトの葉における可溶性酸性インベルターゼの残存活性は、赤熟果実中の残存活性よりは高く(表 3-2-1, 3-2-2)、*Aiv-1* (あるいは *TIVI*) と異なる塩基配列を有する可溶性酸性インベルターゼ遺伝子が葉において発現している可能性は否定できない。

## 7-2 トマト植物における酸性インベルターゼの生理的機能について

トマト果実における可溶性酸性インベルターゼ遺伝子 *Aiv-1* の発現レベルは、解析した全てのステージにおいて野生種 *L. peruvianum* よりも高く（図 1-1-2、2-2-1、5-2-1A）、可溶性酸性インベルターゼが果実における糖蓄積パターンを制御する要因の1つであることが示唆された。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活性の抑制により、トマト果実糖組成が改変された結果（表 3-3-1）はこの仮説を裏付けるものといえる。また、糖組成の変化は、果実のみならずソース器官（成熟葉）においても認められた（表 3-3-5）。従って、可溶性酸性インベルターゼは、組織全般における還元糖量の制御（生成、維持）に関与していると考えられる。一方、ショ糖の蓄積は、還元糖よりも多量の蓄積が可能であるという仮説が提示されている（Yelle et al., 1991）。しかし、ショ糖蓄積量が増大した上記形質転換トマトの果実において、全可溶性糖濃度、可溶性固形物含量が増大する傾向は見出せなかった（表 3-3-1、3-3-3）。従って、還元糖蓄積型からショ糖蓄積型への糖蓄積パターンの変化は糖度の上昇とは無関係である可能性が高い。加えて、野生種 *L. chmielewskii* 果実に見いだされる高糖度形質（High soluble solids content）は、野生種における発現量の低い酸性インベルターゼ遺伝子座（*TIV1* あるいは *sucr*）とは別の複数の遺伝子座が関与するという可能性も示唆されている（Chetelat et al., 1993; Azanza et al., 1994, 1995）。

インベルターゼ、ショ糖合成酵素等のショ糖分解酵素は、シンク器官におけるショ糖の分解により、シンク・ソース間のショ糖濃度勾配を維持し、同化産物の利用効率を制御している可能性が示唆されている（Ho and Baker, 1982; Ho, 1984）。しかし、*Lycopersicon* 属果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性については、種間で著しい差異が見いだされることから、従来から同酵素とシンク能あるいは同化産物蓄積能との関連については疑問が出されていた（Yelle et al., 1991）。アンチセンス遺伝子を導入したトマトの果実の発育、全可溶性糖濃

度、可溶性固形物含量、1個当たりの生重等に変化が認められなかった結果（図 3-3-1、表 3-3-1、3-3-3）は、果実液胞中の可溶性酸性インベルターゼによるショ糖分解率が、同化産物の転流効率を制御する因子とはなり得ないことを示唆している。また、可溶性酸性インベルターゼ活性は、果実成熟期に著しい増大を示すことから、成熟過程あるいは還元糖生成に伴う膨圧の増大による細胞肥大（シンク容量の増大）に関与するという指摘もなされている（Sun et al., 1992）。しかし、アンチセンス *Aiv-1* 遺伝子導入により果実中の可溶性酸性インベルターゼ活性が 99%以上抑制されたトマトにおいては、果実の発育、成熟等は対照果実と同様であり、果実個々の生重、果実中の可溶性固形物含量および全可溶性糖濃度等に変化は認められなかった（図 3-3-1、表 3-3-1、3-3-3）。従って、トマト果実の発育後期（成熟期）に観察される可溶性酸性インベルターゼ活性の殆どは、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と考えられる。

細胞壁結合型酸性インベルターゼは、シンク活性、師部への糖流入（Phloem unloading）過程における還元糖のエネルギー依存輸送等に関与している可能性が、トウモロコシ種子（Cheng et al., 1996）、ソラマメの莢（Weber et al., 1995, 1996）などで示唆されている。本実験においてトマト成熟葉より単離した細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子、*Wiv-1* は、トマトの葉（図 5-2-1）をはじめ、若い茎（図 5-2-1）、さらには小花芽および実生の根（Godt and Roitsch, 1997）等のシンク器官において比較的高い発現を示している。*Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子を導入したトマトにおいて、花粉稔性や着果率の低下が認められた事実は（表 6-3-2）、*Wiv-1* にコードされる細胞壁結合型酵素が、トマトの花器等におけるシンク代謝にも関与することを示唆している。

*Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子、pBWI-2 を導入したトマトのうち、3 個体につ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低下が認められた。3 個体のうちの 1 つ、T248 は矮化を示したが（図 6-3-1）、活性減少の最も顕著であった T423 を含む他の 2 個体の生育状態については、多くのア

アンチセンス遺伝子導入トマトで認められた着果数の減少（表 6-3-2）以外に非形質転換トマトとの差異は認められていない（図 6-3-1）。従って、T248 に観察された生育異常については、遺伝子導入あるいは細胞壁結合型酸性インベルターゼ活性の減少に起因するものではなく、培養変異等、他の要因に起因するものと考えられた。これら 3 個体の形質転換トマトのソース葉では、炭水化物量の顕著な減少が観察された（表 6-3-1）。この結果は、細胞壁結合型酸性インベルターゼがソース葉あるいは茎においてアポプラスト部に流出したショ糖を適宜分解することにより転流量を制御している可能性を示唆するものである。なお、全可溶性糖含量の減少は、可溶性酸性インベルターゼのアンチセンス遺伝子導入トマトのソース葉においても認められた（表 3-3-5）。葉の糖含量は光合成能を左右する可能性が指摘されていることから（Gifford and Evans, 1981）、*Wiv-1* あるいは *Aiv-1* に対するアンチセンス遺伝子を導入したトマトのソース葉における光合成能の測定は興味深い知見を与える可能性がある。さらに、*Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子を導入したトマトを用いたシンク器官への同化産物分配比等の調査も今後興味深い課題になると思われる。

可溶性、細胞壁結合型酸性インベルターゼ遺伝子（*Aiv-1* および *Wiv-1*）のいずれも傷害によりその発現が誘導された（図 5-1-1、5-1-2）。傷害あるいは病害に対するこれら酸性インベルターゼの反応については、傷害組織における呼吸量の増大（Benhamou et al., 1991）、病害抵抗性（Herbers et al., 1996; Hexose sensing）等との関連が示唆されている。今回単離した 2 種の酸性インベルターゼ cDNA に対応する mRNA の傷害時の発現様式にはかなりの差異が認められるため（図 5-1-2）、今後、本試験で作製した *Aiv-1* あるいは *Wiv-1* に対するアンチセンス遺伝子導入植物を供試した病害感染試験等の実施が興味深い知見をもたらすかもしれない。