

氏名(本籍)	おお やま あき お 大山 暁 男 (東京都)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第1,490号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	トマト (<i>Lycopersicon esculentum</i>) 酸性インベルターゼの生理的機能に関する研究		
主査	筑波大学教授	農学博士	高柳 謙治
副査	筑波大学教授	農学博士	岩堀 修一
副査	筑波大学教授	理学博士	藤村 達人
副査	筑波大学助教授	農学博士	弦間 洋

論文の内容の要旨

本研究は、トマトの糖代謝系の重要な酵素である酸性インベルターゼの遺伝子を単離し、その発現様式を解明するとともに、同酵素の生理的機能を逆遺伝学的手法を用いて解析しようとしたものである。

まず最初に、果実における糖蓄積パターンの異なる栽培トマトと近縁野生種 (*Lycopersicon peruvianum*) とを材料として、それぞれの酸性インベルターゼ活性と糖含量を比較した。その結果、栽培トマトでは果実成熟時の可溶性酸性インベルターゼ活性が高く、蓄積する糖が単糖類(還元糖)であるのに対して、野生種では酵素活性が低く、蓄積される糖はショ糖であることを確認した。そこでトマト赤熟果実より、可溶性酸性インベルターゼを単離・精製し、N末端のアミノ酸配列を決定した。これを基にプライマーを合成し、PCRにより可溶性酸性インベルターゼをコードするcDNA; Aiv-1を単離した。これをプローブとして、栽培トマトと野生種の果実における遺伝子の発現状況を調べた結果、栽培トマト果実の各発育段階におけるAiv-1 mRNAの存在量は可溶性酸性インベルターゼ活性のレベルとほぼ一致し、果実成熟期において最大になった。一方、野生種の果実では発育の全ステージでmRNAが検出されなかった。以上のことから、可溶性酸性インベルターゼ活性はmRNAレベルで制御されていることが明らかとなった。

可溶性酸性インベルターゼの生理的機能を推定するために、Aiv-1遺伝子に対するアンチセンス遺伝子を作成して、栽培トマトに導入した。この形質転換トマトでは、赤熟果実における可溶性酸性インベルターゼ活性が、対照植物に比べて99%以上減少していた。さらに、果実および葉におけるショ糖含量が増大し、還元糖類が減少していた。このことは、可溶性酸性インベルターゼがシンク器官(果実)並びにソース器官(成熟葉)における糖組成の制御に関わっていることを示唆している。また、アンチセンス遺伝子導入トマトの植物体および果実の発育については、対照植物との差異が認められなかった。以上のことから、栽培トマトの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は、果実の発育やシンク能の維持にとって必須ではないものと考えられた。

さらに、細胞壁結合型酸性インベルターゼについても、既知の酸性インベルターゼ間で保存性の高いアミノ酸配列を基に合成プライマーを作り、PCRを行い、そのcDNA; Wiv-1を単離した。この遺伝子の発現は葉などの傷害処理時に高く、Aiv-1とは独立して働いていることが示唆された。そこでWiv-1遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入して、細胞壁結合型インベルターゼの生理的機能を調べようとした。Wiv-1のアンチセンス遺伝子を導入したトマトでは、傷害処理葉中の結合型酸性インベルターゼ活性並びにソース葉中の炭水化物量の減少が認められ、同酵素がソース葉中の炭水化物量の変動に関与していることを伺わせた。そのほか、形質転換トマトでは花粉稔性の低下や、着果数の減少が認められ、細胞壁結合型インベルターゼが花器官形成期においても作用して

いる可能性が示唆された。

以上のように、トマトにおける2種類の酸性インベルターゼ遺伝子の構造、発現様式が明らかとなり、さらに、逆遺伝学的手法によりこれらの酵素の生理的機能のいくつかについても解明することが出来た。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文はトマト酸性インベルターゼの生理的機能を解明するために、逆遺伝学的手法を用いてアプローチしようとしたものである。栽培トマトでは果実成熟時の可溶性酸性インベルターゼ活性が高く、蓄積する糖が単糖類（還元糖）であるのに対して、野生種ではその酵素活性が低く、蓄積される糖はショ糖であることに着目して、栽培トマトの赤熟果実より可溶性酸性インベルターゼ酵素を常法により単離・精製し、N末端のアミノ酸配列を決定した。これはトマト属植物からの酸性インベルターゼ単離としては初めてのものであった。それを基にプライマーを合成し、PCRにより可溶性酸性インベルターゼをコードするcDNA；Aiv-1を単離した。これをプローブとして、栽培トマトと野生種の果実発育時における遺伝子の発現状況を調べた結果、この時期の可溶性酸性インベルターゼ活性はmRNAレベルで制御されていることを明らかにした。

可溶性酸性インベルターゼの生理的機能を推定するために、Aiv-1遺伝子に対するアンチセンス遺伝子を作成して、トマトに導入した。この形質転換トマトでは、赤熟果実における可溶性酸性インベルターゼ活性は減少し、果実および葉におけるショ糖含量が増大し、還元糖類が減少していることを確かめた。このことは、可溶性酸性インベルターゼがシンク器官（果実）並びにソース器官（成熟葉）における糖組成の制御に関わっていることを示唆している。このようなアンチセンス遺伝子の導入による内在遺伝子発現の抑制、すなわち逆遺伝学的手法は、遺伝子の働きを解明するための有効な方法であるが、酸性インベルターゼの機能解明に用いられたのは本報告が最初である。

さらに、細胞壁結合型酸性インベルターゼについても、その遺伝子（Wiv-1）を単離し、そのアンチセンス遺伝子を作成した。アンチセンス遺伝子を導入されたトマトでは、傷害処理葉中の結合型酸性インベルターゼ活性が対照植物より低下しており、ソース葉中の炭水化物量に変動が見られた。そのほか、これらの形質転換トマトでは、花粉稔性の低下や、着果数の減少が認められ、細胞壁結合型インベルターゼが花器官形成期においても作用している可能性を示唆した。

以上の逆遺伝学的手法を用いた解析により、トマトの可溶性並びに細胞壁結合型の酸性インベルターゼが、果実の成熟や糖組成決定等に深く関わっていることを示すことが出来た。今後、他の糖代謝に関与する酵素の機能解明や、糖代謝系の制御についての研究に新たな道を拓くための指針となる成果であると評価できる。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。