

氏名	中 務 明
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	農 学
学位授与番号	博乙第 3463 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)
学位論文の題目	Studies on the Internal Regulatory Mechanism of Genes Related to Ethylene Biosynthesis in Tomato Fruit (トマト果実における成熟エチレン生合成の内的調節機構に関する分子生物学的研究)
論文審査委員	教授 稲葉昭次    教授 白石友紀    教授 榊田正治

#### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

トマト果実の発育および成熟に伴うエチレン生合成について、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)、ACC 酸化酵素(ACO)およびエチレンレセプタ遺伝子の発現解析と内的なフィードバック制御機構を調べた。未熟時の微量エチレン生成(システム 1)には *LE-ACS6* が関与しており、その発現はネガティブフィードバック制御を受けていた。成熟時の多量エチレン生成(システム 2)には *LE-ACS2* と *LE-ACS4* が関与しており、ACO 遺伝子(*LE-ACO1*、*LE-ACO4*)とエチレンレセプタ遺伝子(*NR*) の発現量も成熟の進行に伴い増加した。これらの遺伝子はエチレンによるポジティブフィードバック制御を受けていた。システム 1 からシステム 2 エチレンへの移行は特に *LE-ACS6* から *LE-ACS2* への切り替わりが大きく関与していると思われる。

相反する方向のフィードバック制御を受ける ACS 遺伝子(*LE-ACS2*、*LE-ACS6*)について、エチレン応答領域を特定するためにガストランジェントアッセイでプロモーター活性を測定した。約 2.4kb の *LE-ACS2* プロモーターおよび約 2.2kb の *LE-ACS6* プロモーターはポジティブあるいはネガティブなエチレン応答性を十分与えていた。デリション分析により、*LE-ACS2* では-1493bp から-695 bp の間、*LE-ACS6* では-1333bp から-636bp の間にエチレン応答領域が存在することが明らかとなった。

トマト果実の成熟やエチレン生合成関連遺伝子の発現に関与する *E4* および *E8* 遺伝子の発現解析を行った。*E4* および *E8* はエチレンによる強い発現制御を受けていたが、*E4* は未熟段階に関与する要因であり、*E8* はエチレンと無関係な成熟要因でも調節されていると思われる。

以上のように本研究では、トマト果実の発育および成熟過程におけるシステム1とシステム2エチレンの内的調節機構を遺伝子の発現レベルから明らかにするとともに、ネガティブフィードバック制御を受けているACS遺伝子が果実中に存在することを初めて明らかにした。

## 論文審査結果の要旨

果実は、成熟開始直前にエチレン生成が微量（システム1）から多量（システム2）へと転換して成熟が進展する。本研究はトマト果実について、これらのエチレン生合成システムの転換とその内的なフィードバック制御機構を関連遺伝子の発現特性から明らかにしたものである。

まず最初に、エチレン生合成の律速酵素であるACC合成酵素(ACS)とACC酸化酵素(ACO)遺伝子ならびにエチレン受容体遺伝子 (*LeETR1*、*LeETR3*) のcDNAを合計9種類クローニングし、発現解析を行った。その結果、*LE-ACS2*、*LE-ACS4*、*LE-ACO1* および *LeETR3* が成熟開始とともに強く発現誘導されることから、これらの遺伝子がシステム2エチレンに大きく関与していることを示した。しかも、これらの発現はエチレン処理によって緑熟果でも誘導され、さらにエチレン受容体のマスク剤であるMCPの処理により成熟果での発現が消失したことから、これらの遺伝子の発現はエチレンによるポジティブフィードバック制御を受けていることを明らかにした。

次に、ACS遺伝子の発現は未熟果では見られないこと、また成熟果での発現がMCP処理で消失しても酵素活性は残存することから、ネガティブ制御を受けているACS遺伝子の検索を行った。その結果、*LE-ACS6* が未熟果でのみ発現しており、成熟果では発現が消失することを認めた。この未熟果での発現はエチレン処理で消失し、逆に成熟果では消失していた発現がMCP処理により回復したことから、この遺伝子の発現はエチレンによる強いネガティブ制御を受けていることを明らかとし、この特性がシステム1エチレンを微量に抑えている可能性を示した。

そこで、発現制御が相反する方向に制御されている *LE-ACS2* と *LE-ACS6* の制御領域をクローニングし、GUSトランジェントアッセイを用いて、エチレン応答領域がそれぞれ-1493bpから-695bpと-1333bpから-636bpの間に存在することを明らかにした。

さらに、トマト果実の成熟やエチレン生合成の調節的役割が示唆されている *E4* および *E8* 遺伝子についても発現解析を行い、いずれもエチレンによる強いポジティブ制御を受けているものの、*E4* は未熟段階に関与する要因として作用し、*E8* はエチレンとは無関係な成熟要因でも調節されている可能性を示した。

以上のように、本研究は果実の成熟現象の解明に大きく貢献するものであり、博士（農学）の学位に値すると認定した。