

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14851

研究課題名(和文) トマトの単為結果性に関わるPAT-2遺伝子の転写機能を制御するタンパク質の解析

研究課題名(英文) Analysis on proteins that are regulated transcription by PAT2 related parthenocary of tomato.

研究代表者

森 仁志 (Mori, Hitoshi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：20220014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：園芸分野では単為結果性を品種に持たせることは、重要である。トマトの単為結果性を持つ品種から原因遺伝子が転写因子PAT2であることが報告され、PAT2が結合する遺伝子がGA3酸化酵素(GA3ox)である可能性が高くなった。定量PCRで解析した結果、PAT2は子房組織生育初期に発現し生育と共に発現量は減少した。PAT2の減少と共にGA3ox1gの発現は増加した。このことはGA3ox1gの発現は初期にPAT2によって抑制されていると推定できる。さらに子房組織をオーキシン処理するとPAT2の発現は減少した。農業の現場ではトマト果実をオーキシン処理するが、このことを操作していることを意味している。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor PAT2 was found the causal gene of parthenocary in tomato. I identified target gene that was regulated by transcription factor PAT2 in order to analyze molecular mechanism of parthenocary. Pat2 expression was decreased and GA3ox one, that is biosynthesis of active GA, was increased by auxin treatment using quantitative PCR in tomato ovary. Furthermore, Pat2 expression was decreased and GA3ox one was increased during developmental stage of ovary. These results indicated that PAT2 suppress GA3ox transcription and indicated that agricultural auxin treatment to tomato flower is this event.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：単為結果

### 1. 研究開始当初の背景

単為結果は受精によらず、着果および果実の肥大が起こる現象である。園芸分野では単為結果性を品種に持たせることは、果実の品質向上と安定な栽培に重要である。単為結果性をトマト品種に付与できれば、オーキシンによるホルモン処理や花粉媒介昆虫を利用する必要もなく、大いに省力化と経費削減になる。また、猛暑や低温の時でも着果不良を軽減することができる。これまでトマト品種には単為結果性を示す遺伝形質 *pat-2* 遺伝子が古くから知られており、栽培種との交配の結果、国内では単為結果性トマト‘ルネッサンス’、‘パルト’などの品種が育種されてきた。このように園芸上の重要形質であるため、多くの研究が報告され、オーキシンシグナル伝達に関わる *AUX/IAA* 遺伝子 *S1IAA9* や *AUXIN RESPONSE FACTOR 8* 遺伝子およびジベレリンシグナル伝達に関わる *SIDE11a* 遺伝子に関する報告もされている。オーキシン処理がトマトやナスに単為結果を誘発することは農業の現場で行われている上に、ジベレリン処理が単為結果を引き起こすことも報告されている。しかし単為結果性機構を説明できる分子の実体は明らかにされていない。このような状況の中、2014年、国内では農研機構野茶研の福岡らによって、単為結果性原因遺伝子 *pat-2* が同定された。単為結果性トマトでは、*PAT-2* 遺伝子の一部が欠失しており、*PAT-2* 遺伝子が機能を失うと単為結果になると報告されている。これまでの研究から *PAT2* が結合する遺伝子が活性型ジベレリン生合成酵素をコードする GA3 酸化酵素である可能性が高くなった。転写因子として働くので *PAT2* と転写関連因子タンパク質間の相互作用

用を解明する必要がある。この結果を元に *PAT-2* 遺伝子の機能を解明する。

### 2. 研究の目的

*pat-2* 遺伝子は配列から zinc finger homeodomain (ZHD) 転写因子であり、*PAT-2* 転写因子が、GA3 酸化酵素の promoter と結合している可能性が示唆されたので、(1) *PAT-2* 転写因子がどのようにして GA3 酸化酵素遺伝子の転写を制御しているのか解明する。(2) 一般的に ZHD 転写因子は二量体で機能するが、機能抑制には mini zinc finger (MIF) が結合することが多い。従って、*PAT-2* の機能を制御する MIF タンパク質を同定する。(3) 農業実務上、着果のために利用されているオーキシン処理の仕組みを解明する。これらのことにより単為結果性の分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) *PAT-2* 転写因子の target 遺伝子を同定するために子房の成長と共に発現の変動する遺伝子を定量 PCR で検索した。オーキシン処理の影響も調べた。target 遺伝子の候補の promoter と *PAT-2* の結合を AlphaScreen 法で解析した。(2) トマトの場合、*MIF* に相当する遺伝子は 20 種類ぐらいある。*PAT-2* は未受粉から開花直後の子房だけで発現するので、*MIF* も原則として同時期の子房で最もよく発現する遺伝子が候補となる。転写因子として働くので *PAT2* と転写関連因子タンパク質間の相互作用を解明する必要がある。そこで可能性のあるタンパク質 *MIF*、*GAF1*、*DELLA* と *PAT2* との相互作用を解析するために、これらのタンパク質を小麦胚芽無細胞タンパク質合成系で合成した。

#### 4. 研究成果

(1) PAT-2 転写因子の target 遺伝子の同定  
野生型トマト 'モモタロウ' の子房組織にオーキシン処理を施し、定量 PCR により子房内の mRNA 発現量解析を行ったところ、処理後の *Pat2* 発現量は減少した。一方で活性型ジベレリン生合成酵素をコードする *GA3ox* は著しく増加した。オーキシンで発現が誘導される *AUX/IAA9* もオーキシン処理により誘導されることを確認した。各開花ステージにおける発現量解析においても、ステージが進むにつれて *Pat2* は著しく減少し *GA3ox* は増加した。これらから、「転写因子 PAT2 が *GA3ox* の発現を抑制している」という可能性が浮上した。そこで、小麦胚芽抽出液中 (in vitro) 無細胞タンパク質合成系で合成した FLAG-PAT2 タンパク質と、*GA3ox1g* promoter の結合を解析した。免疫沈降法・定量 PCR と、Alpha Screen の 2 通りの手法において、転写因子 PAT2 が *GA3ox1g* promoter にある特定な 6 塩基配列に結合することが明らかになった。さらに、特定塩基配列に変異を入れた DNA 断片とは結合できなかった。次に野生型品種と単為結果性品種において、*GA3ox* 子房内発現量の比較を行ったところ、転写因子 PAT2 が機能しない単為結果性品種の方が、開花ステージの早い段階から *GA3ox* の発現量増加が認められた。また、子房の成長に伴ないジベレリン量も増加した。

#### (2) MIF タンパク質の同定

database で検索すると、トマトには *MIF* に相当する遺伝子は 20 種類ぐらいある。これらの中で PAT2 の zinc finger motif のアミノ酸配列がよく類似し、なおかつ子房で発現する MIF から 3 種類が選抜された。これらの MIF

と PAT2 を yeast two hybrid 法で相互作用を解析すると、2 つの MIF は顕著な相互作用を示した。Zn<sup>2+</sup> の添加によりシグナル強度は上がり、この点も相互作用を指示する結果である。特に 3 種類の MIF のうち MIFb が PAT2 の機能を抑制していると推測された。しかし、これらは in vitro の反応であり、子房細胞内でそれぞれの MIF と PAT2 が相互作用していることを明らかにする必要がある。さらに *GAF1* 遺伝子は 5 種類あるが、これらの発現は顕著な違いを示すものは同定できなかった。

#### (3) オーキシン処理効果の解析

オーキシンは農業作業上、着果を効率よくするために、開花時にトマトーン (オーキシン) で処理している。その結果、単為結果が起こっている。機能として PAT2 が単為結果現象に重要な役割を果たしていることは明かであるが、オーキシンと PAT2 の関係は明かではない。子房組織の成長と開花までの *Pat2* 遺伝子の発現量を経時的に定量 PCR で解析すると、開花に向けて *Pat2* 遺伝子の発現量は減少した。さらにオーキシン処理をすると発現量は顕著に減少した。PAT2 の減少と共に *GA3ox1g* の発現は増加した。このことは *GA3ox1g* の発現は子房組織生育初期に PAT2 によって抑制されていると推定できる。農業の現場ではトマト果実の収量を上げるためにオーキシン処理するが、このことを操作していることを意味している。*Pat2* 遺伝子 promoter 領域の塩基配列を解析すると、オーキシン応答性転写因子 ARF の結合配列が存在した。このことは ARF が *Pat2* の発現を抑制している可能性がある。この可能性を明らかにするためには、*Pat2* promoter 配列と ARF の

相互作用を Alpha Screen 法で解析すれば明らかになると思われるが、今後の研究に依存しなくてはならない。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Yamauchi, T., Yoshioka, M., Fukazawa, A., Mori, H., Nishizawa, N., Tsutsumi, N., Yoshioka, H. and Nakazono, M. (2017) An NADPH Oxidase RBOH functions in rice roots during lysigenous aerenchyma formation under oxygen-deficient conditions. *Plant Cell*, 29, 775-790. 査読有
2. Fukushima, K., Fang, X., Alvarez-Ponce, D., Cai, H., Carretero-Paulet, L., Chen, C., Chang, T.-H., Farr, K. M., Fujita, T., Hiwatashi, Y., Hoshi, Y., Imai, T., Kasahara, M., Librado, P., Mao, L., Mori, H., Nishiyama, T., Nozawa, M., Pálfalvi, G., Pollard, S.T., Rozas, J., Sánchez-Gracia, A., Sankoff, D., Shibata, T. F., Shigenobu, S., Sumikawa, N., Uzawa, T., Xie, M., Zheng, C., Pollock, D. D., Albert, V.A., Li, S. and Hasebe, M. (2017) Genome of pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory. *Nat. Ecol. Evol.*, 1, 0059. 査読有
3. Aohara, T., Mizuno, H., Kiyomichi, D., Abe, Y., Matsuki, K., Sagawa, K., Mori, H., Iwai, H., Furukawa, J. and Satoh, S. (2016) Identification of a xylem sap germin-like protein and its expression under short-day and non-freezing low-temperature conditions in poplar root. *Plant Biotech.*, 33, 123-127. 査読有
4. Bessho-Uehara, K., Wang, D. R., Furuta, T., Minami, A., Nagai, K., Gamuyao, R., Asano, K., Angeles-Shim, R. B., Shimizu, Y., Ayano, M., Komeda, N., Doi, K., Miura, K., Toda, Y., Kinoshita, T., Okuda, S., Higashiyama, T., Nomoto, M., Tada, Y., Shinohara, H., Matsubayashi, Y., Greenberg, A., Wu, J. Z.,

Yasui, H., Yoshimura, A., Mori, H., McCouch, S. R. and Ashikari, M. (2016) Loss of function at RAE2, a previously unidentified EPFL, is required for awnlessness in cultivated Asian rice. *ProNAS*, 113, 8969-8974. 査読有

5. Mizukami, G. A., Inatsugi, R., Jiao, J., Kotake, T., Kuwata, K., Ootani, K., Okuda, S., Sankaranarayanan, S., Sato, Y., Maruyama, D., Iwai, H., Garénaux, E., Sato, C., Kitajima, K., Tsumuraya, Y., Mori, H., Yamaguchi, J., Itami, K., Sasaki, N. and Higashiyama, T. (2016) The AMOR arabinogalactan sugar chain induces pollen-tube competency to respond to ovular guidance. *Curr. Biol.*, 26, 1091-1097. 査読有
6. Sun, Y., Feng, Z., Tomura, T., Suzuki, A., Miyano, S., Tsuge, T., Mori, H., Suh, J-W., Iizuka, T., Fudou, R. and Ojika, M. (2016) Heterologous production of the marine myxobacterial antibiotic haliangicin and its unnatural analogues generated by engineering of the biochemical pathway. *Scientific Reports*, 6, 22091. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 森仁志、村上恭子：ランタンキュラス塊根の吸水発芽時に発現する-galactosidase タンパク質の発現解析。平成30年度春季大会、平成30年3月、奈良
- (2) 服部桃子、佐藤亜沙子、ロイシャ シュテファン、森仁志、白武勝裕、前島正義、河内美樹：モモ葉のホウ素再転流機構解明。第58回日本植物生理学会年会、平成29年3月、鹿児島

#### 6 . 研究組織

(1)研究代表者

森 仁志 (MORI HITOSHI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：20220014