

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658028

研究課題名（和文）

トマトに単為結果性を付与する原因遺伝子の同定

研究課題名（英文）

Identification of the responsible gene for parthenocarpy 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

研究成果の概要（和文）：野菜に単為結果性を持たせる目的のために、単為結果性トマトに単為結果性を付与する原因遺伝子 *pat-2* の分子の実体の同定を試みた。単為結果性トマトの遺伝子の解析は行ったが、最終的に同定できなかった。

研究成果の概要（英文）：For purpose to possess a parthenocarpy in crops, I tried to identify the responsible gene, *pat-2*, for parthenocarpic tomato and analyzed the characterization of parthenocarpic gene. However, I could not determine *pat-2* gene finally.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・園芸学

キーワード：トマト、単為結果、オーキシン、*pat2* 遺伝子

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、今年のような猛暑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遺伝的に単為結果性を示す品種

が古くから知られており、栽培種との交配により、これらの遺伝形質（例えば *pat-2* 遺伝子）を栽培品種に導入する試みが行われ、その結果、単為結果性トマト‘ルネッサンス’のような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、国内を初め欧米でも多くの研究が行われている (Fos et al., *Physiol. Plant.*, 2001)。単為結果性を付与する原因遺伝子は複数あると考えられているが、その機構を説明できる分子の実体が明らか

かにされたものはない。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ことであり、様々な園芸作物に、子房で特異的に発現するプロモーター *DefH9* の下流に、アグロバクテリウムのオーキシン合成酵素遺伝子 *iaaM* を導入すると単為結果性になるという報告 (Ficcadenti, et al., Mol. Breeding, 1999) があるなど、単為結果性にはオーキシンによるシグナルが必要であることに疑問の余地はない。主にアラビドプシスの変異体を単為結果性で選抜した結果、いくつかの変異体が得られているが、いずれもオーキシンのシグナル伝達に関わる変異体であった。

これまでに申請者は非単為結果性トマト ‘moneymaker’ および単為結果性トマト ‘LS935’ の未受粉子房でそれぞれ特異的に発現している遺伝子をサブトラクション法でいくつか同定してきたが、単為結果性の原因遺伝子と明らかに推定できる遺伝子の同定には至っていない。2012 年にはトマト Heinz1706 の全ゲノム配列が報告された。この報告を受け、単為結果性トマト ‘LS935’ および非単為結果性トマト ‘moneymaker’ の全ゲノムを比較するためにリシークエンスすることが、可能になった。

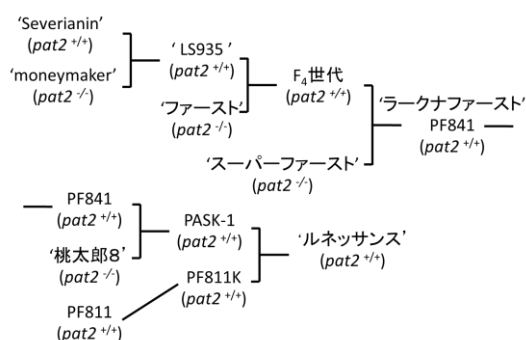
2. 研究の目的

トマトに単為結果性を付与する原因遺伝子 *pat-2* の分子実体を明らかにすることで、単為結果性の分子機構を解明する。‘LS935’ は ‘moneymaker’ で戻し交配して固定したラインであり、両者のゲノム配列上の違いは理論的には単為結果性遺伝子 *pat-2* に関わる配

列であるはずである。その配列を検出後、生化学的、分子生物学的解析により、その配列が単為結果性を付与する遺伝子であることを証明する。

3. 研究の方法

実験材料として、*pat-2* 遺伝子を持った単為結果性トマト ‘LS935’ と非単為結果性トマト ‘moneymaker’ を用いる。‘LS935’ は、単為結果性 ‘severianin’ と ‘moneymaker’ の交配種に ‘moneymaker’ を数回、戻し交配し ‘moneymaker’ を遺伝的背景としている。単為結果性原因遺伝子 *pat-2* は、劣性であり単為結果性 ‘LS935’ では *pat-2* ホモになっている。



‘LS935’ と ‘moneymaker’ の子房から RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行う。

‘LS935’ の雌しべ (子房) で発現しているが、‘moneymaker’ では発現していない遺伝子、逆に ‘moneymaker’ の雌しべ (子房) で発現しているが、‘LS935’ では発現していない遺伝子を検索する。検索された遺伝子の発現を RT-PCR で確認し、同時に両品種のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い、遺伝子の有無を確認する。

両品種からゲノム DNA を調製し、全ゲノム

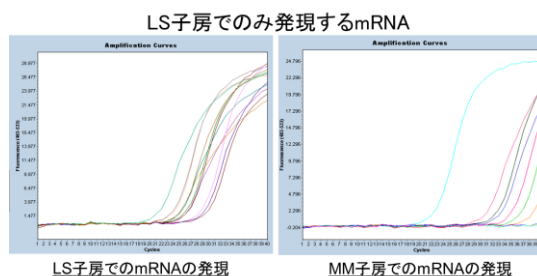
配列の解読リシーケンスを受託解析し、
 ‘LS935’ と ‘moneymaker’ の配列を比較し、
 ‘LS935’ にのみ存在する配列を決定する。
 ‘LS935’ の遺伝的背景が ‘moneymaker’ に
 近いので、理論的に ‘LS935’ にのみ存在す
 る塩基配列の領域は 1 カ所であり、その領域
 に *pat-2* の候補遺伝子が含まれている。この
 領域には ‘LS935’ に特異的な遺伝子が含ま
 れているはずなので、これらの遺伝子の配列
 も利用してリシーケンスを確実にすること
 ができる。リシーケンスの結果として、
 ‘LS935’ にのみ存在する配列を推測するが、
 ‘LS935’ の遺伝的背景が ‘moneymaker’ な
 ので、‘moneymaker’ にのみ存在する配列は
 存在しない。一方、リシーケンスのレファ
 レンス配列は ‘Heinz 1706’ であるから
 ‘LS935’ にも ‘moneymaker’ にも ‘Heinz
 1706’ の配列に対応しない配列が存在する
 可能性はあるが、両者に共通の配列は
 ‘moneymaker’ 由来の配列であるから、候補
 遺伝子の配列にはならない。

‘LS935’ にのみ存在する配列が決定でき
 た場合は、次にこの領域に含まれる遺伝子を
 決定する。既に ‘LS935’ に再度 ‘moneymaker’
 を再交配し、除雄しても単為結果性を保持し
 ている約 30 個体の BCF2 からゲノム DNA を抽
 出し、特定遺伝子を確認する。概ね遺伝子の
 発現する mRNA の塩基配列を推定する。この
 配列を基に当該遺伝子の RNA 発現部位を定量的
 PCR で確認する。生殖器官、特に子房で特
 異的に発現している遺伝子を選抜する。他の
 組織で発現している場合もあるかもしれな
 いが、子房組織で発現していることが不可欠

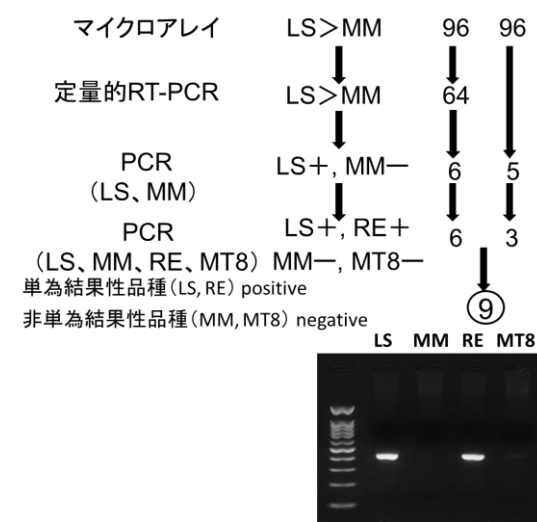
である。‘LS935’ のみならず ‘moneymaker’
 で発現する遺伝子もあるかもしれないが、こ
 の遺伝子は候補にならない。‘LS935’ のみ発
 現していることを確認し、有力な候補とする。

4. 研究成果

マイクロアレイ解析から、‘LS935’ の雌し
 べ (子房) で発現しているが、‘moneymaker’
 では発現していない遺伝子を 200 以上同定し
 た。この中には遺伝子の発現量 (mRNA) に差が
 あることを定量的 RT-PCR 法で確認した。

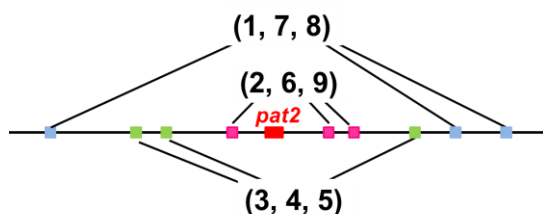


さらに PCR 法によってゲノム DNA から遺伝子
 を増幅したところ、‘LS935’ には含まれるが、
 ‘moneymaker’ には存在しない遺伝子が 9 つ
 同定された。

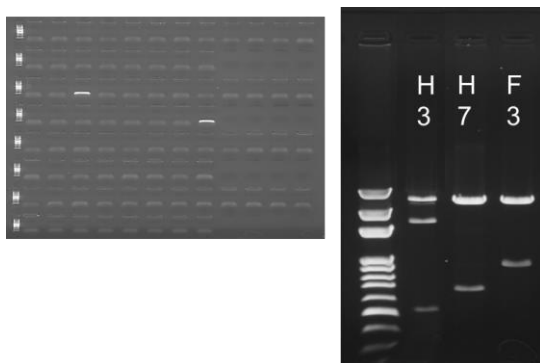


これらの遺伝子の塩基配列の一部は公開さ
 れたトマト品種 ‘Heinz 1706’ のゲノム配列
 には含まれていなかった。このことは

‘LS935’に挿入され、単為結果性を付与する‘severianin’由来のDNA断片の中に‘Heinz 1706’と同等の配列がないことを意味している。さらに‘LS935’に‘moneymaker’を再交配し、118個体の中で、単為結果性を保持している26個体を同定した。この結果はBCF2の単為結果が1:3であることを確認した。これらのBCF2からゲノムDNAを抽出し、9つの特定遺伝子を確認した結果、3つのパターンになり、Pat2に近い遺伝子を推定することができた。



これらの遺伝子は目的遺伝子のPat-2の近傍に位置しているという仮定の下に、‘LS935’の子房から抽出したmRNAを基にcDNAライブラリーを作成し、PCRによるスクリーニングの結果、これらの遺伝子のいくつかのcDNAを単離した。



次に両品種からゲノムDNAを調製し、全ゲノム配列の解読リシーケンスを受託解析し、‘LS935’と‘moneymaker’の配列を比較した。その結果、‘LS935’にのみ存在する配列は全ゲノム配列に対して3%程度であった。

この配列の中に、選抜した9つの配列が存在するか否か判定できていない。

最終年度の最後に競争グループからPat-2遺伝子の単離が報告された。具体的な配列は公開されていないが、該当遺伝子を非単為結果品種に形質転換すると、単為結果性を獲得するデータは示した。この結果は、同定された遺伝子がPat2であることを意味している。

5. 主な発表論文等

該当なし

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