

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660024

研究課題名(和文) 単為結果性に関わるPAT-2転写因子を制御する分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of transcription factor PAT2 regulated parthenocarpy

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トマトの単為結果性原因遺伝子は転写因子PAT2であることが分かった。単為結果性や果実肥大の分子メカニズムを解明するため転写因子PAT2の標的遺伝子の同定を行った。野生型トマト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、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。各開花ステージにおける発現量を解析した結果、ステージが進むにつれてPat2は減少しGA3oxは増加した。これらから、転写因子PAT2が GA3 oxidaseの転写を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor PAT2 was found the causal gene of parthenocarpy in tomato by NARO Institute of Vegetable and Tea Science. I identified target gene that was regulated by transcription factor PAT2 in order to analyze molecular mechanism of parthenocarpy. 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.

研究分野：植物生化学

キーワード：単為結果 転写因子

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、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菜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、目的としては、(1) *PAT-2* 転写因子がどの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。候補の *MIF* を同定後、yeast two hybrid 法で相互作用を解析した。

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、子房の成長に伴うジベレリン量の変動は調べていない。

(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。Zn²⁺ 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。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か否かの解析は行われていない。

(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* 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

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. 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 has now been seen by the referees, whose comments follow at the end of this message. *Curr. Biol.*, 26, 1091-1097. 査読有 DOI: 10.1016/j.cub.2016.02.040

2. Yamauchi, T., Shiono, K., Nagano, M., Fukazawa, A., Ando, M., Takamura, I., Mori, H., Nishizawa, N.K., Kawai-Yamada, M.,

Tsutsumi, N., Kato, K. and Nakazono, M. (2015) Ethylene biosynthesis is promoted by very-long-chain fatty acids during lysigenous aerenchyma formation in rice roots. *Plant Physiol.*, 169, 180-193. 査読有 DOI: 10.1104/pp.15.00106

3.Song, XJ., Kuroha, T., Ayano, M., Furuta, T., Nagoi, K., Komeda, N., Segami, S., Miura, K., Ogawa, D., Kamura, T., Suzuki, T., Higashiyama, T., Yamasaki, M., Mori, H., Inukai, Y., Wu, JZ., Kitano, H., Sakakibara, H., Jacobsen, SE. and Ashikari, M. (2015) Rare allele of a previously unidentified histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. *ProNAS*, 112, 76-81. 査読有 DOI: 10.1073/pnas.1421127112

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