

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18639

研究課題名(和文) トマトの新規単為結果性遺伝子の単離とその単為結果誘導機構の解明

研究課題名(英文) The isolation of a novel parthenocarpic gene of tomato and elucidation of the parthenocarpic mechanism

研究代表者

滝澤 理仁 (Takisawa, Rihito)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：60627363

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、'京てまり'の単為結果性遺伝子の同定とその作用機構の解明を目指して実験を行った。その結果、'京てまり'の単為結果性遺伝子が第1染色体上に座乗するEクラスのMADS-box 遺伝子、SIAGAMOUS-LIKE 6であることが明らかとなった。'京てまり'では、レトロトランスポゾンの挿入によりこの遺伝子の発現が抑制され、それがオーキシンやジベレリンの代謝関連遺伝子の発現を変化させることにより単為結果を誘導すると考えられた。本研究で得られた成果は、トマトにおける単為結果誘導機構の全容の解明に資するだけでなく、トマトの単為結果性品種を育成する上で重要な知見になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we tried to identify the parthenocarpic gene of 'Kyo-Tomari' and clarify the mechanism thereof. As a result, it was revealed that the parthenocarpic gene of 'Kyo-Tomari' is a E class MADS-box gene, SIAGAMOUS-LIKE 6 on the chromosome 1. In 'Kyo-Tomari', the expression of this gene was suppressed by insertion of retrotransposon, which was thought to induce parthenocarpy by regulating the expression of auxin and gibberellin metabolism genes. The results obtained in this study are thought to be important knowledge not only for clarifying the whole part of the parthenocarpic mechanism in tomato but also for developing parthenocarpic tomato cultivars.

研究分野：園芸学

キーワード：単為結果 トマト 植物ホルモン

1. 研究開始当初の背景

単為結果性トマトでは、受粉・受精なしに果実の着果・肥大が起こる。そのため、単為結果性トマトは通常のトマト栽培で必要とされる訪花昆虫による授粉やホルモン剤処理などの作業を省略でき、より省力的で経済的な栽培を可能とする。また、単為結果性トマトの果実の着果・肥大は花粉の稔性に依存しないため、花粉の稔性を低下させる極端な高温や低温のような不良環境条件下でも生産性の高い栽培が可能となる。このように、単為結果性はトマト栽培の省力化と安定化に大きく貢献することから、その誘導機構の解明は農業生産上、非常に重要と考えられる。

京都大学で育成された単為結果性トマト‘京てまり’は、京都市内で生産および販売が行われている栄養繁殖性の単為結果性品種である。この品種は安定した単為結果性を示すだけでなく、比較的強い低温耐性を持つ。‘京てまり’は、単為結果性遺伝子 *pat-2* を持つ‘Severianin’の実生の中から発見された非常に強い単為結果性を示す系統と非単為結果性品種との交配により育成された。そのため、長年の間‘京てまり’は単為結果性遺伝子 *pat-2* を保有すると考えられてきた。しかし、近年、応募者が‘京てまり’の交雑集団で遺伝解析を行ったところ、‘京てまり’が *pat-2* ではない未知の単為結果性遺伝子 (*Pat-k*) を保有することが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、‘京てまり’の単為結果誘導機構の全容を明らかにするため、‘京てまり’が持つ新規単為結果性遺伝子、*Pat-k* の単離とその機能解析、‘京てまり’の単為結果果実における植物ホルモンの定量とその関連遺伝子の発現解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *Pat-k* の単離と機能解析

Pat-k の座乗領域を明らかにするため、‘Micro-Tom’と‘京てまり’の交雑 F_2 集団を供試し、各個体の単為結果率 ($100 \times$ 単為結果果実重 / 受粉果実重) を調査するとともに、Axiom® tomato Genotyping Array を用いて SNP 解析を行った。調査から得られた遺伝子型と表現型のデータを用いて QTL 解析を行い、*Pat-k* の座乗領域を明らかにした。次に、QTL 解析で得られた候補領域を絞り込むため、‘Micro-Tom’と‘京てまり’の交雑 F_3 、 F_4 集団でファインマッピングを行った。最後に、ファインマッピングにより絞り込まれた候補領域から単為結果性遺伝子を同定するため、次世代シーケンサーによる‘京てまり’のリシーケンス解析とダイレクトシーケンスにより候補領域に存在する変異の調査と

確認を行った。

同定された候補遺伝子の子房における発現パターンと‘京てまり’での発現量を明らかにするため、非単為結果性トマト‘ルイ 60’の未受粉および受粉した子房 (開花 1 日前、開花時、開花 1, 3, 5 および 7 日後) と開花 1 日前の‘京てまり’の子房をサンプリングした。サンプリングした試料から RNA 抽出キットで Total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成した。内部標準遺伝子としてハウスキーピング遺伝子を用い、リアルタイム PCR 装置でそれぞれのサンプルにおける候補遺伝子の発現量を定量した。

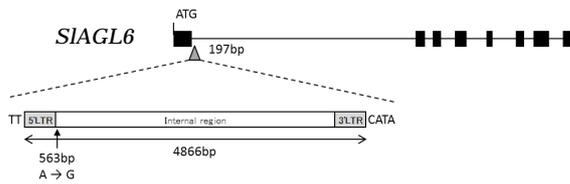
(2) ‘京てまり’の子房におけるインドール-3-酢酸 (IAA) および IAA 代謝産物の定量と IAA およびジベレリン (GA) 関連遺伝子の発現解析

‘京てまり’の単為結果性と植物ホルモンの関連を明らかにするため、IAA および IAA 代謝産物の定量と IAA および GA 関連遺伝子の発現解析を行った。供試品種として‘京てまり’と非単為結果性トマト‘ルイ 60’を供試し、開花 1 日前、開花時、開花 1, 3, 5 および 7 日後の子房をサンプリングした。開花後の子房については、‘ルイ 60’では開花時に受粉したものと開花前に除雄したものを、‘京てまり’については、開花前に除雄したものを準備した。サンプリングした子房から 80% アセトンで IAA および IAA 代謝産物を抽出し、固相抽出用のカートリッジを用いてサンプルを精製した。精製したサンプルを遠心濃縮器で濃縮後、LC-MS/MS を用いて IAA および IAA 代謝産物を定量した。また、サンプリングした子房から RNA を抽出し、IAA および GA の生合成および代謝遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

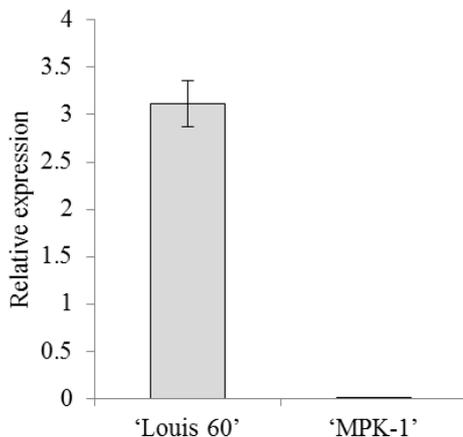
1) *Pat-k* の単離と機能解析

Pat-k の座乗領域を明らかにするため、‘Micro-Tom’と‘京てまり’の交雑 F_2 集団で QTL 解析を行ったところ、第 1 染色体上の 20.9cM で連鎖するマーカー間の領域に QTL が検出された。次に、‘Micro-Tom’と‘京てまり’の交雑 F_3 、 F_4 集団を用いてファインマッピングを行った結果、候補領域を 60 の遺伝子が座乗する 529kb の領域に絞り込むことができた。‘京てまり’の全ゲノムリシーケンス解析とダイレクトシーケンスにより、該当領域内において遺伝子変異の調査と確認を行ったところ、遺伝子の翻訳領域では変異は認められず、E クラスの MADS-box 遺伝子、*SIAGAMOUS-LIKE 6 (SIAGL6)* の第 1 イントロンに 4866bp のレトロトランスポゾン (CopiaSL_37) の挿入が確認された (第 1 図)。



第1図. 'Heinz1706'における *SIAGL6* の構造と '京てまり' における挿入配列. 黒箱と黒線は *SIAGL6* のエキソンとイントロンを示す. 灰色の三角は CopiaSL_37 の挿入部位を, 矢印は A から G への1塩基置換を示す.

次に, 'ルイ 60' の子房で *SIAGL6* の発現解析を行った結果, *SIAGL6* の発現量は開花1日前に最大となり, 受粉後, 急激に低下することが明らかとなった. そこで, 開花1日前の '京てまり' の子房で *SIAGL6* の発現量を調査したところ, ほとんど発現は検出されなかった(第2図). これらの結果から, *Pat-k* と *SIAGL6* は同座であり, '京てまり' では, レトロトランスポゾンの挿入により *Pat-k* / *SIAGL6* の発現が抑制された結果, 単為結果性が誘導されると考えられた.



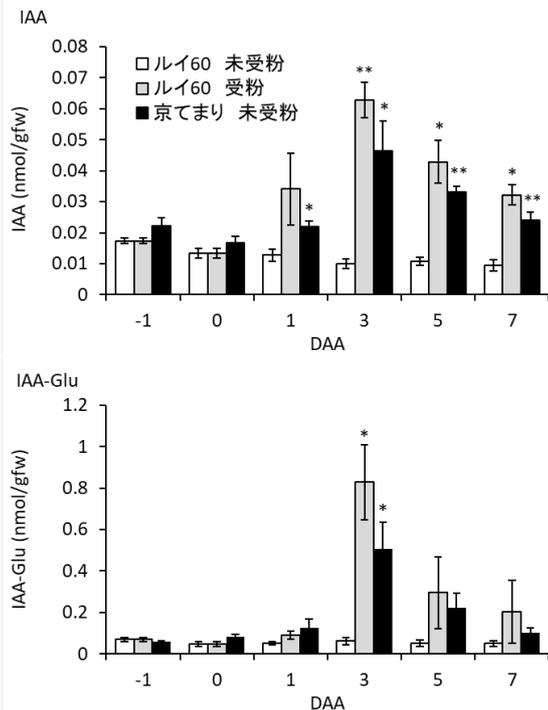
第2図. 開花1日前の 'ルイ 60' と '京てまり' の子房における *SIAGL6* の発現量. 値は平均値 ± 標準誤差を示す (n = 3).

また, これまでの研究で '京てまり' では単為結果性だけでなく強い種子形成阻害が誘導されることが報告されている. そこで, *Pat-k* / *SIAGL6* と種子形成阻害の関係を明らかにするため, ファインマッピングで用いた F₄ 集団で種子数の調査を行ったところ, 単為結果率と種子数は完全に共分離した. このことから, '京てまり' の種子形成阻害についても *Pat-k* / *SIAGL6* の発現の低下が関与していると考えられた.

2) '京てまり' の子房における IAA および IAA 代謝産物の定量と IAA および GA 関連遺伝

子の発現解析

植物ホルモンは植物体内で合成され, 植物の成長を微量で調節する低分子量有機化合物である. これまでの研究で, オーキシン, ジベレリン, サイトカイニン, アブシジン酸, ブラシノステロイド, エチレン, ジャスモン酸などが植物ホルモンとして報告されている. その中でも特にオーキシンとジベレリンは, トマトの果実肥大に深く関与することが知られている. そこで本実験では *Pat-k* / *SIAGL6* の発現抑制がどのように単為結果を誘導するかを明らかにするため, 主要なオーキシンである IAA と IAA 代謝産物の定量, IAA および GA の代謝関連遺伝子の発現解析を行った. 開花後, '京てまり' の子房では, 受粉した 'ルイ 60' の子房と同様に, IAA 生合成遺伝子の発現が上昇し, それに伴い IAA および IAA 代謝産物である IAA-Glu の濃度の上昇が確認された(第3図). また, GA 代謝関連遺伝子の発現解析を行ったところ, '京てまり' では開花後に GA 生合成遺伝子の発現上昇と GA 不活性化遺伝子の発現抑制が認められた. これらの結果から, *Pat-k* / *SIAGL6* の発現抑制は, IAA と GA 生合成遺伝子の発現促進と GA 不活性化遺伝子の発現抑制により, 単為結果を誘導する可能性が示された.



第3図. 開花1日前, 開花時, 開花1, 3, 5 および7日後の 'ルイ 60' と '京てまり' の子房における IAA および IAA-Glu 濃度. 値は平均値 ± 標準誤差を示す (n = 3).

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2件)

Rihito Takisawa, Takayuki Maruyama, Tetsuya Nakazaki, Keiko Kataoka, Hiroki Saito, Sota Koeda, Tsukasa Nunome, Hiroyuki Fukuoka, Akira Kitajima. 2017. Parthenocarpy in the Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Cultivar 'MPK-1' is Controlled by a Novel Parthenocarpic Gene. The Horticulture Journal. 86: 487-492. 査読あり.

Sota Koeda, Rihito Takisawa, Tomoyuki Nabeshima, Yuri Tanaka, Akira Kitajima. 2015. Production of Tomato yellow leaf curl virus-free Parthenocarpic Tomato Plants by Leaf Primordia-free Shoot Apical Meristem Culture combined with in vitro Grafting. The Horticulture Journal. 84: 327-333. 査読あり.

〔学会発表〕(計7件)

Li Jingwei, Rihito Takisawa and Munetaka Hosokawa. Development of cryopreservation protocol for parthenocarpic tomato 'MPK-1'. 園芸学研究 17(別1): 187. 奈良県奈良市. 2018年3月24日.

Jingwei Li, 滝澤理仁, 細川宗孝. 単為結果性トマトの超低温保存技術の開発. Cryopreservation conference 2017. 茨城県つくば市. 2017年11月1日.

滝澤理仁. 2017. 着果処理を省力化できる単為結果性トマト'京てまり'の遺伝解析. 園芸学会近畿支部会. 滋賀県大津市. 2017年9月20日.

滝澤理仁. 2017. 単為結果性トマト'京てまり'の単為結果メカニズムの解明. 第16回けいはんな地区植物科学懇親会. 奈良県生駒市. 2017年7月25日.

日下秀人・滝澤理仁・中崎 鉄也・北島 宣. 2017. 単為結果性トマト'MPK-1'の果実発達におけるオーキシンおよびジベレリン関連遺伝子の発現解析. 園芸学研究 16(別1): 184. 神奈川県藤沢市. 2017年3月20日.

小枝壮太・松本翔太郎・松本湧樹・滝澤理仁・片岡圭子. 2016. 栄養繁殖性トマトの簡易的な培養株維持方法の確立. 園芸学会近畿支部会. 兵庫県神戸市. 2016年8月31日.

滝澤理仁・林井 章・布目 司・福岡 浩之・小枝 壮太・中崎 鉄也・北島 宣. 2015. 単為結果性トマト'ルネッサンス'の種子形成阻害と *Pat-2* 遺伝子型との関係. 園芸学研究 14(別2): 382. 徳島県徳島市. 2015年9月27日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝澤 理仁 (TAKISAWA, Rihito)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 60627363

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし