

令和 元年 9 月 3 日現在

機関番号：12102
 研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
 研究期間：2016～2018
 課題番号：15KK0273
 研究課題名（和文）トマト花弁内におけるエステル化カロテノイド蓄積の分子基盤の解明（国際共同研究強化）
 研究課題名（英文）Exploring molecular mechanisms of carotenoid accumulation in tomato petal (Fostering Joint International Research)
 研究代表者
 有泉 亨 (Ariizumi, Tohru)
 筑波大学・生命環境系・准教授
 研究者番号：70575381
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円
 渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、受粉が無くても果実が肥大する単為結果性の分子メカニズムを解明することを目的とした。矮性トマト品種マイクロトムと、カロテノイド含量が低く単為結果性を示す変異体において、受粉依存的ならびに受粉非依存的着果時（単為結果時）に変動する遺伝子群、代謝産物および酵素群の同定を行った。その結果、いずれの着果時においても糖代謝、解糖系、TCA回路の代謝産物、酵素群の活性が上昇することを明らかにした。特に、解糖系の酵素群は着果に特異的な上昇を示した。また、RNAseq解析を利用し、これらの酵素活性を制御する遺伝子群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

（1）これまで、単為結果性の分子機構は主に転写レベルでのみ解明されていたが、本研究の成果により、着果特異的に変動する代謝産物やその合成を制御する酵素群の同定につながった。特に、代謝レベルでの機構解明に寄与した。

（2）トマトは世界で最も生産される果菜類である。日本では周年生産が確立されているが、特に夏季においては高温障害に起因する着果不良が発生し、収量が安定しない課題がある。本研究の成果により、着果誘導に関する理解が深まった。今後、同定したパスウェイを強化することで着果効率に優れたトマト品種の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：英文最大1000文字

The purpose of this study is to elucidate the molecular mechanism by which parthenocarpy is regulated using tomato dwarf variety Micro-Tom WT and parthenocarpic mutant that shows reduced carotenoid accumulation. Transcriptome, metabolome and enzyme activity in developing young ovaries were examined to identify genes, metabolites and enzymes that are specifically modulated during fruit set initiation. The results obtained here showed that many of carbohydrate, sugar, glycolysis and TCA cycle related pathways were overall induced and genes responsible for modulating enzymes were identified based on the transcript profiles. We also found that starch synthesis becomes active during fruit set. Further, labeled-free shotgun proteome analysis revealed that protein levels were in part correlated with genes expression levels, suggesting that increased metabolism is regulated under the transcriptional control.

研究分野：園芸科学

キーワード：トマト カロテノイド 単為結果

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

トマトは世界で最も生産される果菜類であり、経済的に重要な作物である。日本のトマト栽培は周年栽培が確立しているものの、夏季や冬季などの高温や低温が厳しい季節では着果効率を高める着果作業が不可欠である。一方、受粉が無くても果実が肥大する単為結果性は着果作業を不要とするため、生産の省労力に寄与するが、トマトの単為結果性は広く普及には至っていない。単為結果性は植物ホルモンによって誘導されることが知られるが、その分子メカニズムは不明な点が多い。一方、申請者はエステル化カロテノイドの蓄積に欠陥があり、花卉のクロモプラスト内の顆粒形成が減少した2系統のトマト変異体(*pyp1*, *pyp2*)を単離し、一方、この研究の中で *pyp1/pyp2* 二重変異体を作出したところ、エステル化カロテノイドの生成とカロテノイド総含量が共に劇的に減少する一方、受粉が無くても果実が肥大する単為結果性を示すことを発見した。しかし、その分子機構の解明に向けた研究は実施されていなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではカロテノイドなどの化合物や代謝産物の動態が単為結果時にどのように推移するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 着果時の子房の形態観察

開花4日前、開花2日前、開花日、受粉2日後(開花2日後)、受粉4日後(開花4日後)の子房、および開花1日前に除雄し開花2日後、4日後に相当する未受粉の子房の7ステージにおいて、形態的観察を行なった。これらの子房のパラフィン切片を Hao ら (2015, *Plant Cell Physio*) の方法に従い作成し、10~20 μ m の横断切片を光学顕微鏡下で観察した。

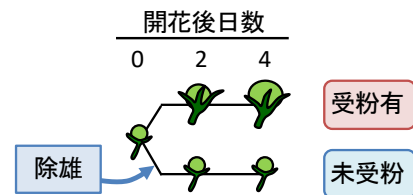


図1. 酵素および代謝産物解析のサンプリングステージ

WT、単為結果変異体の開花後0、2、4日後の子房/果実(受粉有)、また、開花1日前に除雄し、その後の開花2、4日後に相当する子房/果実も利用する(未受粉)。

2) 着果時に変動する代謝産物の同定および酵素活性調査

開花日、受粉2日後(開花2日後)、受粉4日後(開花4日後)の子房、および開花1日前に除雄し開花2日後、4日後に相当する未受粉の子房の5ステージを解析対象とした(図1)。WTと単為結果性変異体より、各ステージで新鮮重80mg以上の子房をサンプリングしてディープフリーザーにて保存した。その後、液体窒素で冷却しながら破砕し、実験に利用するまでディープフリーザー内で保存した。おおよそ20mgの粉末を1解析分の試料として利用した。スクロース、ヘキソース、糖リン酸の代謝産物の測定、ならびに酵素群の活性においては Biais ら (2014, *Plant Physiology*) の方法に従い実施した。合計30種類の酵素の測定を行なった。

(3) 着果時に変動する遺伝子群の同定

上述の記述のステージの子房サンプルに加え、開花2日前の子房も実験に供した。これらの子房サンプルを液体窒素下で凍結破砕した。破砕した粉末からRNAをRNeasy(QIAGEN)を利用して抽出し、illumina HiSeq2000でRNAseqを実施した。得られたリードはtophat2-cufflinksのパイプラインで処理し、発現量を推定した。優位な発現差を示す遺伝子群はedgeRパッケージを利用して同定した。以上の方法はTakei ら (2019, *Frontier in Plant Science*) に従った。

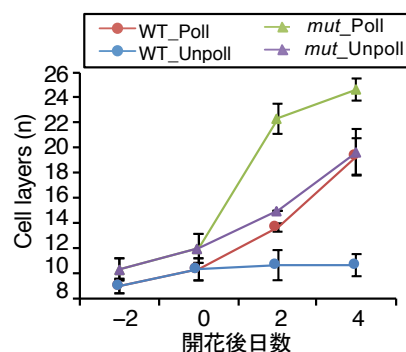


図2. WTと単為結果変異体の着果時の子房肥大
WTと変異体の子房壁を構成する細胞数の推移を調査した。その結果、WTと変異体はともに着果時に細胞層が急激に増加することが分かった。3回の生物学的反復の平均を示した。エラーバーはSEを示す。WT、野生株、mut、変異体。

4. 研究成果

(1) 着果時子房の形態観察

WTと単為結果変異体の子房壁の構成を比較したところ、開花日までは両者ほぼ同様の形態を示していた。WTの未受粉では開花4日後までほとんど肥大しなかったが、WTの受粉子房、変異体の未受粉子房を比較したところ、開花2日後より子房壁を構成する細胞層の増加と細胞肥大が確認され、開花4日後まで肥大傾向が観察された。細胞層の数と1細胞あたりの面積は、WTの受粉子房、変異体の未受粉子房でほぼ同様であり、変異体では未受粉でも細胞分裂と細胞伸長活性を有することが分かった(図2)。

(2) 着果時に変動する酵素群の解析と着果特異的変動酵素の同定

フランス国立農業研究所 (INRA) が保有する代謝産物および酵素測定プラットフォームを利用し、合計6種類の代謝産物と、30種類の酵素の測定を行なった。その結果、Sucrose, Glucose, Fructose, Glucose-1-phosphate, UDP-Glucoseならびにデンプンの含量は受粉依存的な着果時に増加することを明らかにした。また、30種類の酵素のうち、20種類の酵素の活性が上昇することも明らかにした。一方、単為結果性変異体の受粉非依存的(単為結果による)着果時の子房においてもこれらほとんどの代謝産物と酵素群の活性が上昇していることから、受粉依存的な着果と、受粉非依存的(単為結果による)着果は代謝産物の蓄積レベルおよび酵素活性レベルで類似していると考えられた(図3)。

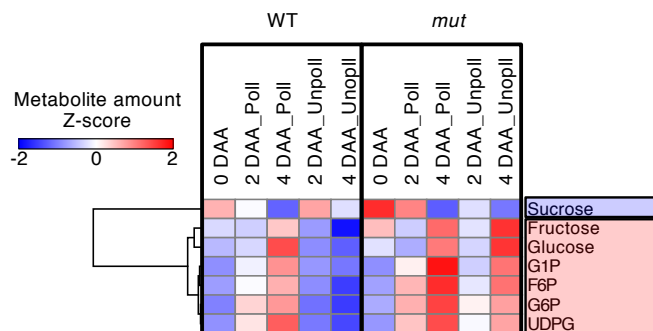


図3. WTと単為結果変異体の着果時の代謝産物の動態

WTと変異体の着果時の子房に蓄積する代謝産物の推移を調査した。その結果、WTと変異体ではともに着果時にsucrose以外の代謝産物が急激に増加することが分かった。WT, 野生株, mut, 変異体。

(3) 着果時に変動する遺伝子群の同定

WTと変異体で有意な発現差を示す遺伝子群 (Differentially Expressed Genes, DEG) を選抜し、パターン解析およびGO解析を行なったところ、着果時ではこれまで報告されている細胞分裂や植物ホルモン関連遺伝子の変動が確認された他、カロテノイド合成関連遺伝子の低下や中心一次代謝経路の遺伝子群の発現上昇が確認された。

以上の結果より、形態的特徴、酵素活性、代謝産物の蓄積、遺伝子の発現パターンで受粉果実と単為結果果実で極めて類似しており、細胞レベル、分子レベルならびに代謝レベルでメカニズムが重複している可能性を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

- (1) Takei H, Shinozaki Y, Yano R, Kashojiya S, Hernould M, Chevalier C, Ezura H, Ariizumi T*. Loss-of-Function of a Tomato Receptor-Like Kinase Impairs Male Fertility and Induces Parthenocarpic Fruit Set. *Front Plant Sci.* 2019 Apr 16;10:403. doi: 10.3389/fpls.2019.00403. eCollection 2019. [査読有り]
- (2) Okabe Y, Yamaoka T, Ariizumi T, Ushijima K, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Kusano M, Shinozaki Y, Pulungan SI, Kubo Y, Nakano R, Ezura H. Aberrant Stamen Development is Associated with Parthenocarpic Fruit Set Through Up-Regulation of Gibberellin Biosynthesis in Tomato. *Plant Cell Physiol.* 2019 Jan 1;60(1):38-51. [査読有り]
- (3) Shinozaki Y, Ezura K, Hu J, Okabe Y, Bénard C, Prodhomme D, Gibon Y, Sun TP, Ezura H, Ariizumi T*. Identification and functional study of a mild allele of *SIDELLA* gene conferring the potential for improved yield in tomato. *Scientific Reports*, 8, 12043, 2018. [査読有り]
- (4) Ezura K, Kim JS, Mori K, Kuhara S, Suzuki Y, Ariizumi T*, Ezura H. Genome-wide identification of pistil-specific genes expressed during fruit set initiation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLOS ONE*, 12, e0180003, 2017. [査読有り]
- (5) 武井瞳, 江面健太郎, 江面浩, 有泉亨. トマトの生産安定化に寄与する単為結果の作用機序. *育種学研究*, 19(4), 137-144, 2017. [査読有り]

[学会発表] (計5件)

- (1) 武井瞳, 篠崎良仁, 矢野亮一, Hernould M, Chevalier C, 江面浩, 有泉亨. 新規受容体様タンパク質 SPFF の機能欠損はトマトの単為結果を引き起こす. 日本育種学会第133回講演会, 九州大学, 2018年3月25-26日.
- (2) Eto K, Ezura K, Okabe Y, Seo K, Yano R, Shirasawa K, Ezura H, Ariizumi T. Identification of the responsible gene of the novel tomato mutant showing parthenocarpy. The 15th Japan Solanaceae Consortium, Tsukuba, October, 2018.
- (3) Ezura K, Shinozaki Y, Bernard C, Prodhomme D, Yves G, Hu J, Sun TP, Ezura H, Ariizumi T.

Yeast two hybrid analysis of DELLA variants and SIGID1s in tomato. Plant and Animal genome Conference XXV, Sandiego, USA. 2018/01/12-2018/1/17

(4) Takei H, Shinozaki Y, Yano R, Hernould M, Chevalier C, Ezura H, Ariizumi T. Loss-of function of SPFF, a novel receptor-like kinase, induces parthenocarpy in tomato. Agri World 2018, Paris, France, 2018/02

(5) Takahara M, Shinozaki Y, Yano R, Okabe Y, Gibon Y, Ezura H, Ariizumi T. Isolation and characterization of novel *procera* mutanta. The 13th Solanaceae Congress (SOL2016),US Davis, USA, 2017/9/12-2017/9/16.

〔図書〕 (計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : Luca Comai

所属研究機関名 : University of California, Davis

部局名 : Plant Biology and Genome Center

職名 : Professor

研究協力者氏名 : Yves Gibon

所属研究機関名 : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

部局名 : Biologie du Fruit et Pathologie

職名 : Leader of the Metabolism group

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。