

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 PETER AMOAKO OFORI

論 文 題 目

Genome-wide identification of tomato ABC transporters and
functional analysis of SlABCB4 involved in auxin transport

論文審査担当者

主 査	名古屋大学准教授	白 武 勝 裕
委 員	名古屋大学教授	谷 口 光 隆
委 員	名古屋大学教授	松 本 省 吾
委 員	名古屋大学講師	太 田 垣 駿 吾
委 員	名古屋大学助教	野 田 口 理 孝

論文審査の結果の要旨

トマトは世界で最も重要な果菜類のひとつであるが、近年では果実を着けるモデル植物として、研究分野で多用されている。その要因として、トマトは高精度な遺伝子予測を含むゲノムデータベース、expressed sequence tag (EST) データベース、完全長 cDNA リソース、トランスクリプトームデータを蓄積した遺伝子発現データベースなど、研究に必要なデータベースやリソースが整備されていることに加え、形質転換体の作出が比較的容易で個体サイズが小さく実験に用いやすい性品種‘マイクロトム’の存在が挙げられる。前述のように、トマトでは高精度な遺伝子予測情報が整備されているが、酵素やトランスポーターなどをコードする遺伝子ファミリーのリスト化や各遺伝子への情報付与は、シロイヌナズナやイネに比べて遅れているのが現状である。

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、ATP 結合領域 nucleotide binding domain (NBD) を持つタンパク質の一群で、そのうち膜貫通領域 (TMD) を持つものはトランスポーターとして機能し、ABC トランスポーターと呼ばれている。ABC トランスポーターは、植物ホルモン、二次代謝産物、有機酸、金属イオン、葉緑体分解産物など、多様な基質を輸送し、様々な植物の生理機能に関わっていることが報告されている。本研究では、トマトのゲノムに存在する ABC タンパク質をコードする遺伝子をリスト化し、遺伝子に付与する作業 (ゲノムワイド解析) を行った。

トマトの ABC タンパク質のリストを作成するために、既知の ABC タンパク質をクエリーに、トマトの二種類のゲノムデータベース、SL3.0/ITAG3.10 (Sol Genomics Network, <http://www.solgenomics.net/>) および TMCSv1.2.1 (TOMATOMICS, <http://plantomics.mind.meiji.ac.jp/tomatomics/download.php>) を検索した。そして、得られた候補に、ABC タンパク質に特徴的な構造 NBD が存在するかを、Pfam web server (<http://pfam.xfam.org/>) により確認し、NBD が存在しないものや極端にアミノ酸配列が短いものをリストから除いた。その結果、トマトには 154 種類の ABC タンパク質が存在することが明らかとなった。

これら 154 種類のトマトの ABC タンパク質について、NBD および TMD の数とそれらの配向性の確認を行うと共に、分子系統樹解析によるサブファミリーの分類を行ったところ、9 種類が ABCA サブファミリー、29 種類が ABCB サブファミリー、26 種類が ABCC サブファミリー、2 種類が ABCD サブファミリー、2 種類が ABCE サブファミリー、6 種類が ABCF サブファミリー、70 種類が ABCG サブファミリー、そして 10 種類が ABCI サブファミリーに分類されることが明らかとなった。154 種類の ABC タンパク質のうち、47 種類は TMD を持たない可溶性 ABC タンパク質で、残りの 107 種類が複数の TMD を持つ ABC トランスポーターであることが明らかとなった。また、ABC トランスポーターのうち、54 種類が TMD と NBD を 2 個ずつ持つフルサイズ ABC トランスポーターで、53 種類が TMD と NBD を 1 個ずつ持つハーフサイズ

ABC トランスポーターであった。

同定した 154 種類のトマトの ABC タンパク質について、tomato eFP browser (http://bar.utoronto.ca/efp_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi) から、遺伝子の発現データを取得したところ、ABC タンパク質をコードする遺伝子の多様かつ特徴的な発現様式が明らかとなった。例えば、*SIACB25*, *SIABCC22*, *SIABCD1*, *SIABCI3* は様々なトマトの器官・組織で恒常的な発現を示しており、トマトの成長を支える基礎的機能を担っていることが示唆された。一方、*SIACB20*, *SIABCC10*, *SIABCC11*, *SIABCC21*, *SIABCF6*, *SIABCG17*, *SIABC17* は果実成長において特徴的な発現を示し、果実成長に関わる物質の輸送に関わることが示唆された。さらに、完全長 cDNA リソースからクローンが入手可能な *SIACB4*, *SIABCC11*, *SIABCG7*, *SIABCG8*, *SIABCG9*, *SIABCG12*, *SIABCG13*, *SIABCG17*, *SIABCG22*, *SIABCG28*, *SIABCG36* については、全長配列を決定し、そして半定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、*SIABCC11* が果実成長後期に高い発現を示すことが示された。*SIABCC11* およびそのホモログの機能は不明で、その基質は分からないが、果実への何らかの物質蓄積に関わっているものと考えられ興味深い。tomato eFP browser では根や若い果実で高い発現を示し、半定量的 RT-PCR で恒常的な発現を示した *SIACB4* は、シロイヌナズナのオーキシン輸送体 AtACB19 と極めて高い相同性を持つため、果実におけるオーキシンの分配に関わっている可能性が考えられた。そこで、次に、*SIACB4* に着目し、*SIACB4* の細胞内局在の検定、オーキシンの輸送活性の測定、定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析、また、形質転換体の作出を試みた。

トマトにおいてオーキシンは果実肥大のトリガーとして働き、花への外生的なオーキシン処理により単為結果が誘導される。受粉果においては、種子でオーキシンが合成され、そのオーキシンが子房内に分配され、果実成長のトリガーとなることが報告されている。このように、トマト果実の成長にオーキシンとその分配が重要であることが報告されており、一部のオーキシントランスポーター、PIN-FORMED (PIN), PIN-LIKES (PILS), AUXIN1/LIKE-AUX1 (Aux1/LAX) の機能が報告されている。その一方で、トマトにおける ABC トランスポーター型 (ACB サブファミリー) のオーキシントランスポーターの機能解析は進んでいない。そこで、上記のトマトの ABC タンパク質の網羅解析で見出した、果実で発現するオーキシントランスポーターの候補 *SIACB4* の機能解析を行った。

まず、*SIACB4* の細胞内局在明らかにするために、*SIACB4* と GFP の融合タンパク質を *Nicotiana benthamiana* の葉で一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、GFP 蛍光は FM4-64 による細胞膜の染色像、そして細胞膜マーカーである PIP1;4 と mCherry の融合タンパク質の局在と一致し、*SIACB4* が細胞膜に局在することが明らかになった。

次に、SIACB4 がオーキシンの輸送活性を持つかを、*N. benthamiana* の葉での一過的発現系と、酵母での異種発現系により確認した。SIACB4 をアグロバクテリウムを介して、*N. benthamiana* の葉で一過的に発現させ、葉からプロトプラストを調製し、オーキシン indole-3-acetic acid (IAA) またはサイトカイニン benzoic acid (BA) の排出活性を測定した。その結果、SIACB4 を発現させてタバコプロトプラストで、有意な IAA の排出活性が認められたが、BA の排出活性は対照区と差が無く、SIACB4 は特異的なオーキシン排出活性を持つことが確認できた。さらに、SIACB4 を酵母で異種発現させたところ、SIACB4 発現酵母での IAA の輸送活性が高まった。以上の結果から、SIACB4 はオーキシン輸送活性を持ち、植物細胞においてオーキシンの排出機能を担うことが明らかとなった。

tomato eFP browser では根や若い果実で高い発現を示し、半定量的 RT-PCR で果実において恒常的な発現を示した *SIACB4* の発現を、定量的 RT-PCR により確認した。その結果は、tomato eFP browser の結果に類似していたが、根での発現はそれほど高くなかったが、果実成長初期に高い発現を示した。前述のように、受粉後のトマト果実における種子から果肉へのオーキシンの分配は重要であり、SIACB4 が若いトマト果実におけるオーキシンの分配に関わっていることが示唆された。

そこで、トマト‘マイクロトム’において *SIACB4* を RNAi によりノックダウンしたが、明確な表現型は見られなかった。前述のように、オーキシンの輸送には PIN, PILS, Aux1/LAX など複数のファミリーが関わっており、また、SIACB4 以外の ABCB がトマト果実におけるオーキシン輸送に関わっている可能性が考えられる。トマト果実におけるオーキシンの輸送を明らかにするには、SIACB4 に加え今後 SIACB4 以外のオーキシン輸送体の機能を明らかにしていく必要があることが示唆された。

以上のように、本研究では、これまでにトマトで遺伝子ファミリーの整理が行われていなかった ABC タンパク質・ABC トランスポーターファミリーについてゲノムワイド解析を行うことで、その全容を明らかにした。この情報は今後のトマトの ABC タンパク質・ABC トランスポーターファミリー研究の基盤となる情報であり、関連研究分野における大きな貢献である。また、本研究では、SIACB4 が細胞膜に局在し、細胞からのオーキシンの排出活性を持つことを示すと共に、SIACB4 が若いトマト果実におけるオーキシンの分配に関わっていることを示唆する結果を得た。本研究の結果は、トマトやナス科植物における ABC タンパク質・ABC トランスポーターの研究に大きく貢献するものであり、審査委員会は本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値があると認め、論文審査に合格と判定した。