

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 5 月 20 日現在

機関番号	: 12102
研究種目	: 若手研究 (B)
研究期間	: 2011~2012
課題番号	: 23780001
研究課題名 (和文)	トマト変異体バイオリソースの育種的利用による果実肥大特性の包括的評価
研究課題名 (英文)	Comprehensive genetic evaluation of tomato fruit expansion by the breeding use of mutant bioresources
研究代表者	有泉 亨 (ARIIZUMI TOHRU)
	筑波大学・生命環境系・助教
	研究者番号: 70575381

研究成果の概要 (和文):

本研究では、果実肥大性が変化した 4 種類のトマト変異体を用いて、これら変異が蓄積した多重変異体を作成して、(課題 1) トマトの果実肥大特性がどこまで強化できるか、また、(課題 2) 1 系統の変異体において、その原因遺伝子を明らかにすることを目的とした。多重変異体の解析の結果、果実肥大特性は変異を蓄積させると強化されることが分かった。本研究では 2 系統の変異体の原因遺伝子を同定する事ができた。いずれも新規の遺伝子であり、この 2 遺伝子の解析を通じて単為結果性と果実肥大性を制御する分子メカニズムの新たな知見を得ることができると期待される。

研究成果の概要 (英文):

This research explores the possibility whether addition of different mutations associated with fruit size results in increased fruit expansion (subject 1), and aims to isolate the responsible gene for one of the fruit size mutant (subject 2). Genetic analysis indicated double mutants showed increased fruit expansion, consistent with our prediction. In this research, genome sequences of two out of four mutants were determined by next generation sequencing and it appeared that these two genes encode novel proteins that control fruit size.

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	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: 農学

科研費の分科・細目: 農学・育種学

キーワード: トマト、変異体、果実肥大、交配育種

1. 研究開始当初の背景

トマトは野菜の生産量世界最大級の作物であり、その栄養価の高さから人類の健康の維持と促進に欠かせないものになっている。一方、我が国ではトマトの自給率が低く、大部分を輸入に頼っている。この現状を打破するためには、より効率的に収量増が可能となる品種開発が必要である。トマト栽培では着果を安定させるために果実着果剤(植物ホルモン処理)や花粉媒介昆虫の利用が行われているが、前者は大

きな労力を要し、後者は高コストが問題である。トマトの効率的・安定的生産のためには、受粉・受精無しで果実肥大が起こる単為結果性を強度に示す品種や、果実バイオバスが増加した果実肥大性の優れた品種の開発が有効だと考えられる。

単為結果性や果実肥大性は、ジベレリンやオーキシシンなどの植物ホルモンが関わっていることが示唆されているが、これらの性質を制御する分子メカニズムの実体は不明瞭な点が多い。また、単為結果性

と果実肥大性においては、各々の性質に着目した研究は幾つか報告されているが、両性質の有機的な関係を明確に解明した報告はなされていない。例えばトマトの花に果実着果剤を処理すると単為結果性が引き起こされて果実が成長するものの、最終的な果実バイオマスに大きな変化は見られないため、両性質はある程度異なるメカニズムでコントロールされていると考えられる。さらに果実作物全般において、様々な遺伝子変異の蓄積により、果実の肥大特性をどこまで高める事ができるのか、についての知見は未だに乏しい。

2. 研究の目的

申請者はEMS やガンマ線照射により作出された矮性トマト系統マイクロトムの約 10,000 系統の突然変異誘発系統(M2 世代)から、受粉・受精無しで果実が発達する単為結果性変異体や、果実バイオマスが増加した果実肥大性変異体の網羅的スクリーニングを行ってきた。これらのうち、単為結果性あるいは果実肥大性を顕著に示す独立な 4 系統に着目して研究を行った。

本研究ではこの独立な 4 系統のトマト変異体を用いて、それぞれの変異を蓄積させた多重変異体を作成して、単為結果性や果実肥大性がどこまで強化できるかを明らかにしたい。一方で 4 系統の変異体のうち、1 つの変異体(e6902 系統)は強い単為結果性と果実肥大性を同時に示す、非常にユニークな変異体であることが分かっている。この遺伝子は単為結果性と果実肥大性のマスターレギュレーターをコードしている可能性がある。本研究ではポジショナルクローニング法と高速シーケンサーを用いる事で原因遺伝子の同定を目指したい。以上の研究により、効率的・安定的に果実結実を示し、かつ果実バイオマスが大きい品種の開発、および重要果実形質を制御する新たなメカニズムの解明を目指し、トマト変異体が有する遺伝子変異の育種的利用の可能性を明らかにしたい。

3. 研究の方法

本研究では、変異を蓄積させて果実形質を向上できるかどうかを調査するために、(課題 1)4 系統の表現型が異なるマイクロトム変異体間で交配育種を行い多重変異体を作成して、単為結果性と果実肥大性を評価する。また、(課題 2)単為結果性と果実肥大性の両性質を示す e6902 変異体の原因遺伝子を同定する事を目的とし

て、F2 分離集団を用いたポジショナルクローニングを行って候補領域のラフマッピングを行う。次に変異体の全ゲノム DNA 配列を高速シーケンサーを利用して解読する。候補領域内の遺伝子において、突然変異が存在する遺伝子を抽出し、F2 分離集団との連鎖解析を行って原因遺伝子の候補を単離する。原因遺伝子の相補性検定を行って、原因遺伝子を特定する。

(課題 1)マイクロトムの果実変異体を用いて果実形質をどこまで向上させることができるのか?

(課題 1-A).果実変異体の雌蕊形態観察

4 つの果実肥大性変異体では、雌蕊の大きや雌蕊数が野生株 WT と比較して変化していることが分かっている。そこで、光学顕微鏡および走査型顕微鏡を用いてこれら変異体の雌蕊発達過程を調査した。

(課題 1-B).変異蓄積と果実肥大性の評価

この課題では、より強い単為結果性と高い果実重を示す系統の作出を目的として、各々の変異体同士を交配して、二重変異体(e2811/e5457, e5457/e300, e5457/e6902, e300/e6902)を作成して、それらの表現型、単為結果性、果実肥大性を評価した。単為結果性の評価は、除雄した花のうち、どれだけの雌蕊から果実が形成されたかを調べた。果実肥大性は果実 1 つ当たりの重さと、1 つの個体から形成される全果実の重さを調べた。

(課題 2) マイクロトムのユニーク変異体の原因遺伝子を同定する

(課題 2)-A. 原因遺伝子同定に向けたラフマッピング

e6902 変異体の原因遺伝子を同定するために、変異体とトマト栽培品種 Ailsa Craig との間で F2 分離集団を作成し、ポジショナルクローニングを行った。DNA マーカーは既報の SSR マーカーおよび SNP マーカー、あるいは SNP タイピングアレイを利用した。次に、連鎖解析によって絞り込んだ領域内に存在する遺伝子をデータベースより抽出した。

(課題 2)-B. F2 組換え個体プールゲノム DNA 配列の解読

(課題 2)-A で作成した F2 分離集団の中で、変異体の表現型を示す F2 組換え個体よりゲノム DNA をプールにして抽出した。プールしたゲノム DNA 配列を、高速シーケンサー HiSeq2000 を利用して決定した。

得られた塩基配列のアセンブルを行い、(課題 2)-A で抽出された遺伝子において、アセンブルした全てのリード内で共通の変異が見られた遺伝子を同定した。候補遺伝子が得られたので、その遺伝子変異と F2 分離集団との連鎖解析を行った。

一方、当初計画の課題外であったが、変異体 *e5457* においても同様の実験を行なった。

4. 研究成果

(課題 1)

それぞれの変異体の雌蕊の形態観察を行なった。*e300*、*e5457* 変異体では雌蕊を構成する心皮数が増加しており、がくや花弁、あるいは葯の数にも変化が見られた。両変異体とも子房の中に存在する子室数も増加していた。一方 *e6902* 変異体は、二層の心皮が形成されていることが分かった (WT では通常一層) (図 1)。

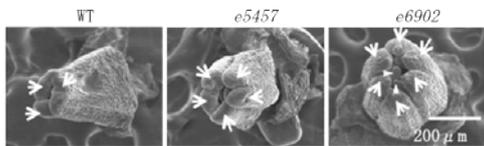


図1. 変異体ではめしべを構成する心皮数が増加する。WT では通常3枚の心皮(矢印)からめしべが構成されるが、*e5457* 変異体では5枚以上の心皮が、*e6902*変異体では二層の心皮(外側が矢印、内側を△で示している)が形成されている。

次に、4 種類の変異体同士を交配して、それぞれの二重変異体を作成し、それらの表現型、単為結果性、果実肥大性を評価した。その結果、*e2811/e5457*、あるいは *e5457/e6902* 二重変異体では果実肥大性が著しく上昇し(1.4~2 倍)、形成された果実はほとんど種無しであったことから、単為結果性も付与されていたことが明らかとなった(図 2)。一方、*e5457/e300* 二重変異体は極矮性を示し、果実を形成しなかった。また *e2811/e300*、*e300/e6902* 二重変異体の作出を何度も試みたが、二重変異体を得ることができなかった。以上のことから、変異体 *e300* を利用して多重変異体を作成することは、何らかの理由で抑制されていると考えられた。



図2. マイクロトム変異体の果実形態。二重変異体では果実肥大性が上昇した。

現在、三重変異体の作出を行っており、同様に果実肥大性と単為結果性を評価する予定である。

(課題 2)

変異体 *e6902* の原因遺伝子を同定するために、トマト栽培品種 *Ailsa Craig* との間で F2 分離集団を作成し、遺伝分析を行なった。28 個体の F2 集団と 60 個の SSR マーカーを用いて原因遺伝子の絞り込みを行なった結果、原因遺伝子が座乗している領域を明らかにした。次に、変異体の全ゲノムシーケンスを決定し、トマト参照ゲノム (SL2.40) およびマイクロトム野生株ゲノムへとマッピングを行ない、変異体に存在する SNP の抽出を行なった。この結果、絞り込んだ領域内に存在する SNP の中で、アミノ酸変異が引き起こされた遺伝子を 1 つ同定した。この遺伝子は果実肥大に関わる既報の遺伝子ではなく、新規の遺伝子であった。

一方、同様に *e5457* 変異体でも同様の実験を行なった。*e5457* と *Ailsa Craig* との間で作成した 43 個体の F2 雑種集団と 60 個の SSR マーカー、および SNP タイピングアレイを利用して絞り込みを行なった。次に上述と同様に変異体のゲノム DNA 配列を決定し、絞り込んだ領域内に存在する非同義置換変異を抽出したところ、1 つの候補遺伝子が選抜された。この遺伝子も果実肥大に関わる既報の遺伝子ではなく、新規の遺伝子であった。

それぞれ得られた原因遺伝子の変異と変異体の表現型の連鎖解析を行い、変異が表現型と連鎖していることを確認した。

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 1 件)

① Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H: Genes that influence yield in tomato. *Breeding Sciences* 2013, 63, 3-13, DOI: 10.1270/jsbbs.63.3

[学会発表] (計 7 件)

① Kimura A, Ariizumi T, Okabe Y, Saito T, Asamizu E, Sakakibara H, Kojima M, Ezura H. Characterization of tomato bubble fruit mutants which form bubble-like fruit structure at the tip of fruit. 第 54 回日本植物生理学会 2013 年 3/21~3/23 岡山大学

② Kimura A, Ariizumi T, Okabe Y, Saito T, Asamizu E, Sakakibara S, Kojima M, Ezura H: Analysis of effect of the bubble fruit mutation on pistil development, ploidy levels, and fruit structure in tomato. *International Symposium on Japanese Solanaceae Genomics Initiative (JSOL)* 2013 (招待講演) 2013 年 2/8~2/9 筑波大学

③ Shinozaki Y, Hao S, Fei Z, Zhong S, Giovanonni J, Rose JK, Ezura H, Ariizumi T: RNA-seq based Transcript Profiling of Auxin-dependent Fruit Set in Tomato. International Symposium on Japanese Solanaceae Genomics Initiative (JSOL) 2013 (招待講演) 2013年2/8~2/9 筑波大学

④ Hao S, Ariizumi T and Ezura H: Cytological Dissection and Genetic Interaction of Two Tomato Carpel Mutants. The 5th Japan-China-Korea Graduate Student Forum, Tsukuba, Sep 21th-24th, 2012

⑤ Kimura A, Ariizumi T, Okabe Y, Saito T, Asamizu E, Ezura H: Isolation and cytological characterization of tomato bubble fruit mutants. 第122回日本育種学会 2012年9/14~9/16 京都産業大学

⑥ 有泉 亨, 木村あかね, 羽尾周平, 森一樹, 江面健太郎, 岡部佳弘, 篠崎良仁, 増田順一郎, 鈴木穰, 斎藤岳士, 久原哲, 青木考, 江面浩: トマト果実分化機構解明に向けた新規遺伝資源開発 第122回日本育種学会 2012年9/14~9/16 京都産業大学

⑦ Hao S, Ariizumi T Saito S, Ezura H: Cytological dissection of tomato carpel mutants, The 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Joint Conference (SOL&ICuGI 2011), Kobe Convention Center, Nov 28th-Dec 2nd, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/Plant/MolecularBreeding/index.html>

<http://olericulture-tsukuba.org/manaer>

http://olericulture-tsukuba.org/ariizumi_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有泉 亨 (ARIIZUMI TOHRU)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：70575381