

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01461

研究課題名(和文)大規模変異体集団と新規高糖変異体を活用したトマトの糖蓄積分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular dissection of sugar accumulation in tomato using a large scale mutant population and high-sugar mutants

研究代表者

江面 浩(EZURA, Hiroshi)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00332552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トマトの新規高糖変異体を活用した糖蓄積の新規分子機構解明に挑戦した。その結果、F-box遺伝子の一つであるSIHWS遺伝子が果実への糖蓄積に次の2つの点から関与していることを明らかにした。1点目はSIHWS遺伝子が果実の糖輸送に関わる維管束組織の発達に関与していること、2点目はSIHWS遺伝子が果実での糖合成やデンプン合成系の遺伝子と連動して糖蓄積を制御していることが示唆された。これらの結果から、SIHWS遺伝子を介した果実の高糖性の分子育種の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実への糖蓄積機構は、植物が進化過程で発達させた重要形質であり、その完全理解に向けて世界中で凌ぎを削っている分野である。本研究は、今まで着目されていなかったSIHWS遺伝子が果実への糖蓄積の一翼を担っていることを初めて示したものであり、学術的意義が大きい。果実への糖蓄積制御は、高付加価値果実の生産において重要な技術開発テーマである。現在までは、主に栽培技術により高糖度化を進め、一部、育種的に高糖度化が進められている。本研究により、果実の糖蓄積に関する新分子機構の一端が明らかになったことにより、果実の高糖性の分子育種への道が開けると考えられ、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：High sugar is an important breeding trait in fruit crops including tomato. Using a unique tomato mutant conferring higher sugar accumulation, we have tried to elucidate a novel molecular mechanism of sugar accumulation in fruits. We showed that SIHWS, one of F-box genes involved in sugar accumulation in tomato fruits through following two mechanisms. The SIHWS regulates a development of vascular bundle tissue which is a route of sugar transport. The SIHWS also co-regulate expressions genes which are responsible for sugar and starch metabolism. These novel information will provide a new tool of molecular breeding of high sugar accumulation in fruits.

研究分野：植物分子育種学、園芸生理学

キーワード：トマト 高糖変異体 F-boxタンパク質 糖蓄積

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高糖性はトマトの市場価値を決定する重要形質であり、現在は主に栽培技術を駆使して高糖度果実が生産されている。栽培技術による高糖化はストレス栽培を行って達成されているが、収量性が大幅に犠牲になっている。このような背景から、一般栽培を行っても高糖性を示すトマト品種の開発に対する期待は極めて大きい。研究代表者らは、先行研究で独自に開発したマイクロトマトの大規模変異体集団から一般栽培を行っても高糖性を示す変異体（後に *Slhws* 変異体と命名）を選抜した（江面ら、特願 2015-156140）。本変異体はストレス栽培をしなくても高糖性を示し、収量性も維持される特性を有するとともに単為結果性も示す。本変異体の原因遺伝子の同定を進めたところ、新規 F-box タンパク質をコードする遺伝子（以下、F-box 遺伝子：Solyc01g095370）内の変異が原因であることが判明した（江面ら、特願 2015-156140）。さらに、申請者らが保有する TILLING ライブラリーから同遺伝子内に点変異を有する 3 つの変異体を単離したところ同様に高糖性を示した。これらのことからこの新規 F-box タンパク質が糖蓄積に関与していることが強く示唆された。一方、F-box タンパク質が制御する糖蓄積は新規の知見であり、分子機構の詳細は全く不明である。なお、*Slhws* 変異体では、単為結果性と果実の高糖度性に加えて、葉の形態や頂芽の性質にも異常が観察された系統があった。

2. 研究の目的

高糖性はトマト果実の市場価値を決定する重要形質であり、主に栽培技術を駆使して高糖度果実が生産されている。現在の栽培技術による高糖化はストレス栽培を使って達成されており、収量性が大幅に犠牲になっている。研究代表者らは先行研究で独自に開発したトマトの大規模変異体集団から一般栽培を行っても高糖性を示す変異体を選抜し、その原因遺伝子が新規 F-box タンパク質をコードする遺伝子であることを明らかにした。本研究は、この新規 F-box タンパク質遺伝子が制御するトマト果実の糖蓄積機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

上記の研究目的を達成するため、以下の 4 つの研究解析を行った。

(1) 新規 F-box 遺伝子の機能検証

我々がトマト高糖変異体の単離・解析から同定した新規 F-box タンパク質遺伝子のバイオインフォマティクス解析を行った結果、シロイヌナズナで同定されている *HAWAIIAN SKIRT* 遺伝子 (*AtHWS*) やイネで同定されている *ERECT PANICLE 3* 遺伝子 (*OsEP3*) のオーソログ遺伝子であることが示唆された（以下、*SlHWS* と記載）。そこで、*SlHWS* 遺伝子のネイティブプロモーター遺伝子を使い *AtHWS* と *SlHWS* を *Slhws* 変異体で発現する相補実験を行い、得られた形質転換体の表現型を調査した。

(2) *SlHWS* 遺伝子の発現解析と *Slhws* 変異体の糖輸送組織の観察

Slhws 変異体は、栽培時期や発達過程に応じて植物体の形態異常が誘導されることから、*SlHWS* 遺伝子の発現部位の特定を行った。*SlHWS* 遺伝子のネイティブプロモーター遺伝子に GUS 遺伝子を連結したベクターを構築し、トマトの野生型に導入した形質転換体を作成した。得られた形質転換体の器官・組織における GUS 遺伝子の発現解析を行った。その結果を受け、*Slhws* 変異体の糖輸送に関わる組織や器官の野生型との形態比較を行った。

(3) *Slhws* 変異体における糖代謝関連遺伝子の発現変化

SlHWS 遺伝子の変異体における Brix 糖度上昇の原因の特定のため、可溶性糖画分および登熟中に蓄積し赤熟期に分解されることで果実の糖度に強く影響を及ぼすデンプンの蓄積量を、*Slhws* の種なし及び種あり果実について、高速液体クロマトグラフィーと酵素学的手法によって解析した。さらに緑熟期、ブレイカー期、赤熟期の登熟 3 点について、種なし果実のトータル RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行い、KEGG パスウェイ情報および既知の糖輸送体情報をもとに、糖代謝関連遺伝子のうち発現変動を示すものを選抜し傾向の解釈を行った。さらに、*Slhws* 変異体における高糖性に強く関連すると推測される遺伝子について定量 RT-PCR による確認および種あり果実と種なし果実での発現比較を行った。

(4) 果実の高糖度性の確立に関する遺伝子の網羅的探索と検証実験

緑熟期、ブレイカー期、赤熟期の登熟 3 点について、種なし果実のトータル RNA を抽出し、RNA シーケンス解析を行い、統計的に有意に発現変動を示す遺伝子を抽出した。これらをトマトの参照ゲノム情報を元にエンリッチメント解析を行い、統計的に有意に発現変動する遺伝子を生理学的機能、タンパク質情報を元にクラス分けを行った。得られた候補遺伝子の変異体を、筑波大学で NBRP が保有管理する EMS 変異体ライブラリに対するエクソームシーケンス結果から参照できる SNP を探索した。そのなかで有意と見込まれる SNP を持つ変異系統を選抜し、その表現

型を確認した。さらに精度よく目的遺伝子の変異による表現型を評価するために野生型マイクロトムとの戻し交配を3回行い、バッククロス系統を作製する。

4. 研究成果

上記4つの研究解析を行った結果、以下の4つの成果が得られた。その研究成果概要、学術的意義、社会的意義はまとめの通りである。

(1) 新規 F-box 遺伝子の機能検証

*SIHWS*を発現した *Slhws* 変異体の形質転換体では、当該変異体で見られた葉の形態(葉が左右に湾曲する、複葉性や鋸歯が単純化する)や頂芽の性質(茎頂分裂組織の発生が停止する)などの異常が回復された(図1)。さらに、果実の単為結果性と高糖度性も野生型と同様に回復した。*AtHWS*を発現した *Slhws* 変異体の形質転換体でも、当該変異体で見られた形質変化はほぼ回復した。以上の結果から、*SIHWS* 遺伝子は、*Slhws* 変異体の原因遺伝子であること、*AtHWS* のオーソログ遺伝子であることが確定できた。

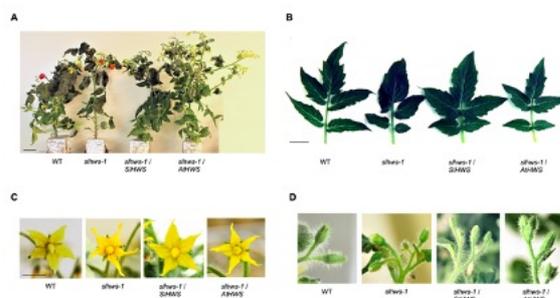


図1. トマト及びシロイヌナズナのHWS遺伝子を発現した変異体の表現型の回復

(2) *SIHWS* 遺伝子の発現解析と *Slhws* 変異体の糖輸送組織の観察

SIHWS 遺伝子のネイティブプロモーター遺伝子に *GUS* 遺伝子を連結した形質転換体の観察を行った結果、*GUS* 遺伝子は植物体の発達時期及び部位特異的に発現していること、特に茎頂など各種分裂組織や維管束通道組織とその周辺部で強く発現していることが判明した。続いて、維管束通道組織は糖輸送に深く関与していることから、*Slhws* 変異体の維管束通道組織の形態の詳細な観察を行った。その結果、*Slhws* 変異体では野生型に比べ維管束通道組織が肥厚し、果実への糖輸送が強化された組織構造になっていることが示唆された(図2)。実際に観察した果実へ通する小花柄から採取した師管液中にはより多くの糖類(ショ糖、果糖、ブドウ糖)が含まれていた。以上の結果から、*Slhws* 変異体の高糖性の一因は、当該遺伝子変異の結果、糖輸送に関わる維管束通道組織の構造変化が誘導され、より多くの糖が果実に輸送されることによると考えられた。

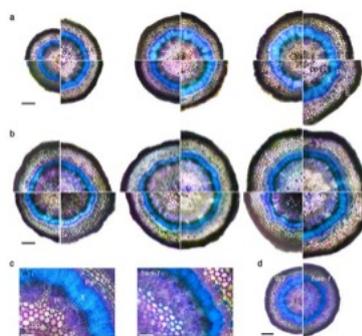


図2. トマト *Slhws* 変異体の花柄切片の比較観察

(3) *Slhws* 変異体における糖代謝関連遺伝子の発現変化

Slhws 変異体果実の糖度は、種なし果実では全体的に上昇する傾向が示され、特にショ糖とデンプン蓄積量が顕著に増加した。一方、種あり果実ではショ糖の蓄積量は増加するものの、デンプン蓄積量については野生型と比較して大きな差はなかった。これは、*Slhws* 変異体における高い Brix 値が確かに糖の蓄積量の増加に起因することを示し、さらに種子の存在に依存しないショ糖の蓄積量増加と種子の存在が負に影響するデンプンの蓄積量増加の2つの要因によっておこる可能性が示された。

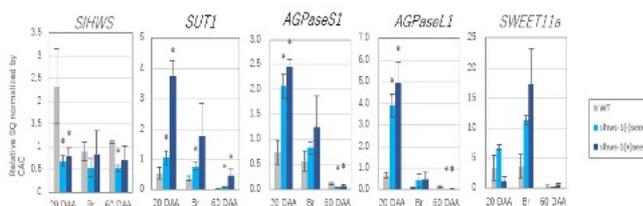


図3. トマト *Slhws* 変異体果実での糖・デンプン代謝遺伝子の発現比較

デンプン合成酵素 *AGPaseS1*、*L1* およびショ糖輸送体 *SUT1* 遺伝子の有意な発現上昇を確認した。これらは種子の有り無しに依存せず、よって *SIhws* 遺伝子の変異によって発現変動している可能性が示唆された。RNA-シーケンスおよび定量 RT-PCR の結果 (図 3)、デンプン合成酵素である *AGPaseL1* と *S1*、ショ糖輸送体である *SUT1* が種子の存在に依存せず、有意に発現上昇することが確認された。また、同じくショ糖輸送体の一種と考えられるクレード 3 に属する *SWEET* 遺伝子の発現上昇が確認された。以上の結果から、*SIhws* 変異体では、1) 各ショ糖輸送体遺伝子の発現上昇によって転流糖であるショ糖の果実への取り込み能を向上させた結果、糖代謝の下流に位置するデンプン合成やその他可溶性糖の蓄積量を増加させ、2) デンプン蓄積量の増加には、デンプン合成酵素の他に種子の存在に影響を受ける他の要因が関わる、という仮説を立てることができた。

(4) 果実の高糖度性の確立に関する遺伝子の網羅的探索と検証実験

一般的なボルケーノプロットによる上位 20 位までの発現変動遺伝子の選抜結果とエンリッチメント解析の結果は、いずれも *ANL2* (*Anthocyanin less 2*) 遺伝子を含んでいた。この遺伝子は、2013 年の Kinbara らの報告によると、転写制御遺伝子の一種であり、その変異体トマトは果実でショ糖を蓄積する傾向を示したと報告されている。そのメカニズムについては不明な点が多く残るため今後のさらなる研究が必要であるが、今回解析した中で、*SIhws* 変異とその表現型をつなぐもっとも可能性の



図 4. トマト *SIhws* 変異体果実での糖・デンプン代謝遺伝子の発現比較

高い候補であると考え。我々が保有する EMS 大規模変異体集団からこの遺伝子の変異体選抜を行った結果、アミノ酸置換を引き起こす SNP をホモで有する変異体が単離できた。バックグラウンド変異が多く存在する個体での表現型の調査の結果ではあるが、植物丈の増加、複葉の歪曲、中程度の Brix 値上昇傾向など *SIhws* 変異体に似た、ただしよりマイルドな表現型が観察された。これらのいくつかはグリーンハウス栽培・植物工場栽培の異なる栽培条件で変化したことから、環境の影響を受けやすいことが推測された (図 4)。これは *SIhws* 変異体における表現型が環境によって変動することを説明する一因である可能性を想起させた。さらに精度よく目的遺伝子の変異による表現型を評価するために、現在野生型マイクロトムとの戻し交配を 2 回まで行っている。バッククロス系統の完成までは時間の都合上残念ながら及ばなかったが、研究を継続予定である。

(5) まとめ

本研究では、トマトの新規高糖変異体を活用した糖蓄積の新規分子機構解明に挑戦した。その結果、F-box 遺伝子の一つである *SIHWS* 遺伝子が果実への糖蓄積に次の 2 つの点から関与していることを明らかにした。1 点目は *SIHWS* 遺伝子が果実の糖輸送に関わる維管束通道組織の発達に関与していること、2 点目は *SIHWS* 遺伝子が果実での糖合成やデンプン合成系の遺伝子と連動して糖蓄積を制御していることが示唆された。これらの結果から、*SIHWS* 遺伝子を介した果実の高糖性の分子育種の可能性が示唆された。

本研究では、*SIHWS* 遺伝子を介したトマトの糖蓄積機構の一端が明らかになった。果実への糖蓄積機構は、植物が進化過程で発達させた重要形質であり、その完全理解に向けて世界中で凌ぎを削っている分野である。本研究は、今まで着目されていなかった *SIHWS* 遺伝子が果実への糖蓄積の一翼を担っていることを初めて示したものであり、学術的意義が大きいと考える。

果実への糖蓄積制御は、高付加価値果実の生産において重要な技術開発テーマである。現在までは、主に栽培技術により高糖度化を進め、一部、育種的に高糖度化が進められている。本研究により、果実の糖蓄積に関する新分子機構の一部が明らかになったことにより、果実の高糖性の分子育種への道が開けると考えられ、社会的意義が大きいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Damayanti F, Lombardo F, Masuda JI, Shinozaki Y, Ichino T, Hoshikawa K, Okabe Y, Wang N, Fukuda N, Ariizumi T, Ezura H	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional disruption of the tomato putative ortholog of HAWAIIAN SKIRT results in facultative parthenocarp, reduced fertility and leaf morphological defects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.01234	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lombardo Fabien, Gramazio Pietro, Ezura Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Increase in Phloem Area in the Tomato Hawaiian Skirt Mutant Is Associated with Enhanced Sugar Transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 932 ~ 932
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12060932	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Farida Damayanti, Fabien Lombardo, Naoya Fukuda, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura
2. 発表標題 Characterization and evaluation of F-box gene tomato mutant for its high sugar content
3. 学会等名 The 15th Solanaceae Conference (SOL2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Farida Damayanti, Yoshihiro Okabe, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura
2. 発表標題 Phenotypic and genetic characterization of tomato mutants with mutation in F-Box genes
3. 学会等名 SOL2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Farida Damayanti, Yoshihiro Okabe, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura
2. 発表標題 Phenotypic and genetic characterization of new parthenocarpic tomato mutants with mutation in F-Box genes
3. 学会等名 PAG2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	LOMBARDO Fabien (LOMBARDO Fabien) (00607393)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	矢野 亮一 (YANO Ryoichi) (00443044)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	
研究分担者	岡部 佳弘 (OKABE Yoshihiro) (30752951)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	長嶺 愛 (NAGAMINE Ai)	生命環境系・研究員 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	永田 俊文 (NAGATA Toshifumi)	生命環境系・研究員 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関