

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252008

研究課題名(和文)大規模変異体集団を利用したトマト重要形質の解析

研究課題名(英文)Elucidation of important breeding traits in tomato using a comprehensive mutant population

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) 34,500,000円

研究成果の概要(和文)：モデルトマト品種マイクロトムの大規模変異体集団とその集団から変異体を効率的に選抜するTILLING技術を駆使し、果実の日持ち性や糖度、及び花成などトマトの重要育種形質発現の分子機構を明らかにすることを目的とした。その結果、各形質に関わる新たな遺伝子変異を明らかにするとともに、糖度制御については新たな関与遺伝子を同定した。新たな日持ち性に関わる遺伝子変異が日持ち性改良育種に有効であることも実証した。これらの成果は、トマトの重要育種形質発現の分子機構の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this study are to extending our knowledge on a molecular mechanism underlying important breeding traits including self-life and sugar accumulation of fruits and flowering, using a comprehensive mutant population based on Micro-Tom tomato which is a model cultivar of studying fruit development, and the effective mutant screening technology, TILLING. We have isolated and characterized new mutant alleles in genes reported as related genes which regulate such important breeding traits, while we have identified a novel gene accounting for sugar accumulation in tomato fruits. We have also demonstrated that some of new mutant alleles are useful for improving self-life of tomato fruits. These results will contribute to elucidate a molecular mechanism of important breeding traits.

研究分野：植物分子育種学

キーワード：トマト 重要形質 日持ち性 糖度 花成

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子情報に基づいて作物改良を行う分子育種技術が世界的な広まりを見せている。重要園芸作物であるトマトにおいても DNA マーカー等を使った分子育種技術が病害虫抵抗性改良を中心に普及している。一方、他の重要育種形質については、分子育種を行う基盤となる重要育種形質発現の分子機構についての情報が不足していた。

(2) 研究代表者等は、モデルトマト品種マイクロトムを用いて変異誘発処理を行い、大規模変異体集団を作成していた (Saito et al., 2011)。さらにその変異集団から特定の DNA 塩基配列に点突然変異が導入された変異体をハイスループットに選抜できる TILLING 技術も開発していた (Okabe et al., 2011)。これらの成果により、トマトでは重要育種形質発現の分子機構解明のための研究基盤が出来上がっていた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者グループが保有するマイクロトムの研究基盤（大規模変異体集団と TILLING 技術）及びオミックス解析ツール等を駆使し、トマトの重要育種形質発現の分子機構を明らかにすることを目的とする。特に、(1) 果実の日持ち性制御、(2) 果実の糖度制御、(3) 花成制御に着目し、各形質発現の分子機構を解明し、それに基づいて各形質の分子制御技術を提案し、さらに、その一部については有効性を実証することを目的とする。

3. 研究の方法

具体的には、以下の3つの研究を行う。

(1) TILLING 技術により既知の各形質の関連遺伝子変異体を選抜し、固定・表現型解析を行う。

(2) 変異体と野生型に対してオミックス解析などの比較解析を行い、各形質の分子ネットワークの解析を行う。

(3) 各育種形質について得られた変異体と知見を活用し、重要育種形質のための分子育種技術の提案と有効性の実証を行う。

4. 研究成果

(1) 日持ち性制御機構解析

エチレン生合成遺伝子について 8,448 系統の変異体集団から TILLING により *ACS2* で 12、*ACS4* で 2、*ACO1* で 13、*ACO4* で 4 系統のミスセンス変異体を獲得した。これらの変異体では、果実成熟期のエチレン生成量に変化がみられる系統は数系統得られたが、日持ちの面では野生型と比較し、有意な違いは見られなかった。エチレン生合成関連遺伝子の多くは複数のホモログを持ち、単独遺伝子の変異では成熟を抑制することは困難であ

ることが示唆された。

追熟期に活性化する *ACS* と *ACO* の転写制御を抑えることで日持ち性が向上できると期待できるため、エチレン生合成を制御する既知の転写因子 *RIN* と *NOR* について 8,448 系統の変異体集団から選抜を行った。その結果 *RIN* で 6、*NOR* で 8 系統のミスセンス変異体及び 2 系統のナンセンス変異体が獲得できた。得られた変異系統の果実の日持ち性およびエチレン生合成量等の表現型の評価を行い、果実の日持ち性の良い変異系統の選抜を行った。その結果、*nor* ナンセンス変異体の 1 系統は、ホモ個体の成長が顕著に遅れ、赤熟しないことが確認できたため、更に詳細な解析を行った。

新奇 *nor* 変異体は、野生型に比べエチレン合成量が有意に低下した (図-1)。変異体でエチレン合成量低下する原因は、果実成熟に連れて *ACS* 遺伝子が発現増加するにもかかわらず、*ACO3* が発現しないことによって ACC が酸化されず、エチレン合成が阻害されているためと判明した。また転写因子 *RIN* は *NOR* に制御されることも示唆された。EMS 変異系統に加えて、RNAi 法および CRES-T 法を用いて *NOR* 発現制御形質転換系統を作成し、その形質解析から *NOR* が果実成熟過程に影響していることを重ねて検証した。*NOR* と相同性が高い 3 つの *NOR-like* 遺伝子において機能重複が見られた。選抜された新奇 *nor* 変異体は新たな育種材料として実用品種と交配し、日持ち性向上効果を検証する。

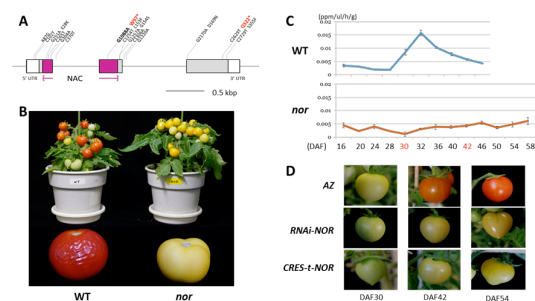


図-1 EMS 変異体 *nor* の機能解析

(A) TILLING 法を用いて転写因子 *NOR* に確認された変異箇所、(B) 機能欠失変異体 *nor* の果実に対する影響、(C) 果実成長各段階におけるエチレン生合成量変化、(D) *NOR* 遺伝子発現抑制系統の果実表現型の比較。

トマトゲノム中で同定されている 6 種類のエチレン受容体遺伝子 (*SLETR1-6*) について変異体の選抜と表現型解析を行い、*Sletr4*, *5*, *6* の変異体が果実成熟過程に差異を有することを明らかにし、これらの受容体が果実成熟中に機能していることを初めて示唆した。さらに、*Sletr1* 変異体の比較解析を行い、変異導入箇所により感受性変化の強弱が変化することを明らかにした。これらの変異体の中で *Sletr1-2* 変異体については、日持ち性改良に有効な育種素材であることを

検証した。

(2) 糖度蓄積制御機構解析

TILLING により、糖度関連遺伝子 *SIVPE5* のミスセンス変異体を 6 つ、ナンセンス変異体を 1 つ得た。このうち、ミスセンス変異変異体 *w620* の赤熟期果実において、酸性インペルターゼ活性の上昇とグルコースとフラクトース含量の増加を確認した。一方、この系統における顕著な Brix 値の増加は確認されなかった。次に、*SIVPE5* による糖の制御機構を解明するために、*SIVPE5* 遺伝子発現を抑制させた形質転換体と野生株トマトの赤熟期果実のタンパク抽出液を利用して、二次元電気泳動を行った結果、酸性インペルターゼが特に変動しているタンパク質として検出された。即ち、*SIVPE5* は酸性インペルターゼの酵素活性を制御することで糖代謝を制御していると推測された。

果実の高糖度性に寄与する新たな遺伝子の同定を目指し、大規模変異体集団を用いて変異体の探索を行った。その結果、野生株と比較して果実の Brix 値の上昇を示す変異系統 *E8986* の単離に成功した。次世代シーケンサーを用いた全ゲノム配列解読の結果、機能未知の F-box タンパク質をコードする遺伝子内の変異を見出した。また、TILLING 法を用いて取得・確立した 3 つのアレル系統の変異ホモ個体において果実の高糖度性を確認した。さらに表現型解析を進め、当該遺伝子の欠損により、単為結果果実の形成及び葉の形態異常を示すことが判明した。同定した新規 F-box タンパク質による果実における糖蓄積、葉の発生、受粉後の果実の発達の統合的な制御機構の存在が示唆された。

(3) 花成制御機構解析

トマトの花成ホルモンである SFT ファミリーに属する SP5G に焦点を当てて、TILLING による変異体の選抜および *SP5G* 過剰発現体の解析を行った。*sp5g* 欠損変異体は 1 系統しか得られなかったが、花成が野生型よりも早まったことから、SP5G は花成を負に制御することが考えられた。過剰発現体の表現型として、栄養成長が促進され、生殖成長が抑制されたことから、SP5G は花成を負に制御することが証明された。また、トマトの花成ホルモンである SFT は葉で合成され、師管を通り、茎頂に移動して花成を誘導することが知られている。そこで、過剰発体を台木にして、発芽直後の実生を穂木として接ぎ木をすることで、SP5G が移動するかどうかについて検討した。その結果、穂木の花成は野生型を台木にした場合と変わらなかったことから、SP5G は移動性をもたず、葉において花成を間接的に制御していることが示唆された。

概日時計遺伝子である *ELF3* はシロイヌナズナでは欠損すると花成が促進される。そこでトマトにおける機能解析を行うために

TILLING 法により選抜を行い、6 系統の *elf3* 欠損変異体を得た。そのうちの 2 系統が野生型よりも早期開花および第一花序までの葉数が少ない表現型を示した (図-2)。開花が最も早い系統では、第 2 葉展開時に花芽原基が分化し、そのときの葉数は 4 枚であることを電子顕微鏡で確認した。これらのことから、シロイヌナズナと同じようにトマトにおいても *ELF3* は花成を負に制御する遺伝子であり、この遺伝子が欠損したことで花成が促進されたことが示唆された。

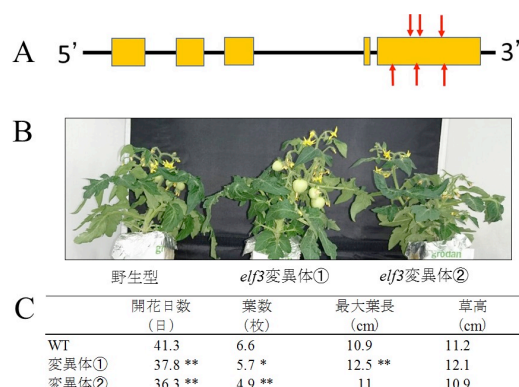


図-2 EMS 変異体 *elf3* の機能解析

(A) TILLING 法を用いて *ELF3* にアミノ酸置換が確認された変異箇所、(B) 変異が表現型に与える影響、(C) 変異が花成および生育に与える影響。

<引用文献>

Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Yamazaki Y, Fukuda N, Mizoguchi T, Aoki K, Ezura H (2011) TOMATOMA: A novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant and Cell Physiology*. 52(2): 283-296.

Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Bres C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H (2011) Tomato TILLING technology: Development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant and Cell Physiology*. 52(11): 1994-2005.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Wang N, Duhita N, Ariizumi T, Ezura H (2016) Involvement of vacuolar processing enzyme SIVPE5 in post-transcriptional process of invertase mediated in sucrose accumulation in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 査読有. 108:71-78.

DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.06.037

2. Mubarak S, Okabe Y, Fukuda N,

Ariizumi T, Ezura H (2016) Favorable effects of the weak ethylene receptor mutation *Sletr1-2* on postharvest fruit quality changes in tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*. 査読有. 120:1-9. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2016.04.022

3. Mubarak S, Okabe Y, Fukuda N, Ariizumi T, Ezura H (2015) The potential use of a weak ethylene receptor mutant *Sletr1-2* as a breeding material to extend fruit shelf-life of tomato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 査読有. 63(36): 7995-8007. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02742.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 発表者名 : 紫葉隆則、菊池太良、立澤文見、棚瀬京子、有泉亨、王寧、江面浩、加藤一幾
発表標題 : TILLING 法によるトマトの花成制御突然変異体の選抜および解析.

学会等名 : 園芸学会平成 29 年度春季大会

発表年月日 : 2017 年 3 月 19 日~3 月 20 日

発表場所 : 日本大学生物資源科学部、神奈川県、藤沢市

2. 発表者名 : Kazuhisa Kato, Junki Oikawa, Yuka Ishigami, Satomi Shimoyama, Takanori Shiba, Fumi Tatsuzawa, Riichiro Yoshida, Kyoko Hiwasa-Tanase, Ning Wang, Tohru Ariizumi, Tsuyoshi Mizoguchi, Hiroshi Ezura

発表標題 : Involvement of SELF PRUNING 5G in the floral and sympodial regulation in a day-neutral plant tomato.

学会等名 : The 13th Japan Solanaceae Consortium JSOL2016

発表年月日 : 2016 年 11 月 25 日

発表場所 : 国際基督教大学、東京都、三鷹市

3. 発表者名 : Ning Wang, Katsuki Nada, Di Liu, Miyako Kusano and Hiroshi Ezura

発表標題 : Genetic characterization of EMS-mutagenized Micro-Tom for study activities of functional genomics.

学会等名 : The 2nd Asian Horticultural Congress.

発表年月日 : 2016 年 9 月 26 日~9 月 28 日

発表場所 : Chengdu, China.

4. 発表者名 : Di Liu, Ning Wang, Kyoko Tanase, Nattiwong Pankasem, Haoting Chen, Miyako Kusano and Hiroshi Ezura

発表標題 : Characterization of *NOR* mutant alleles isolated from EMS mutagenesis Micro-Tom.

学会等名 : The 13th Solanaceae Conference SOL2016.

発表年月日 : 2016 年 9 月 12 日~9 月 16 日

発表場所 : University of California, Davis, USA.

5. 発表者名 : Syariful Mubarock, Yoshihiro Okabe, Tohru Ariizumi, Naoya Fukuda, Hiroshi Ezura

発表標題 : The potential use and favorable impact of a weak allele tomato ethylene receptor mutant, *Sletr1-2*, on the postharvest fruit quality changes in tomato.

学会等名 : The 10th International

Conference on the Plant Hormone Ethylene.

発表年月日 : 2015 年 11 月 14 日~11 月 18 日

発表場所 : Chongqing, China

6. 発表者名 : Ning Wang, Toru Ariizumi, Hiroshi Ezura

発表標題 : Relevance of sucrose accumulation to the impact of vacuolar processing enzyme (SlVPE5) mediated invertase activation.

学会等名 : The 12th Solanaceae Conference SOL2015.

発表年月日 : 2015 年 10 月 25 日~10 月 29 日

発表場所 : Bordeaux, France

7. 発表者名 : 下山さとみ、及川純希、石上由佳、立澤文見、棚瀬京子、有泉亨、王寧、江面浩、加藤一幾

発表標題 : トマトの成長相転換における花成制御遺伝子の機能解析.

学会等名 : 第 33 回日本植物細胞分子生物学会 (東京) 大会・シンポジウム

発表年月日 : 2015 年 8 月 10 日~8 月 12 日

発表場所 : 東京大学、東京都文京区

8. 発表者名 : Junki Oikawa, Yuka Ishigami, Fumi Tatsuzawa, Tohru Ariizumi, Ning Wang, Hiroshi Ezura, Kazuhisa Kato

発表標題 : Analysis of floral regulatory genes in a day-neutral tomato.

学会等名 : The 11th JSOL International Symposium on Solanaceae Genomics JSOL2014.

発表年月日 : 2014 年 10 月 25 日~10 月 26 日

発表場所 : 名古屋大学、愛知県名古屋

9. 発表者名 : 及川純希、石上由佳、立澤文見、有泉亨、王寧、江面浩、加藤一幾

発表標題 : 中性植物トマトの花成制御関連遺伝子の解析.

学会等名 : 第 32 回日本植物細胞分子生物学会 (盛岡) 大会・シンポジウム

発表年月日 : 2014 年 8 月 21 日~8 月 22 日

発表場所 : いわて県民情報交流センター (アイーナ)、岩手県盛岡市

10. 発表者名 : Ning Wang, Duhita Narendra, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura

発表標題：A vacuolar processing enzyme
(*SIVPE5*) dependent post-translational
modification of acid invertase is required
for sugar accumulation in tomato fruit.
学会等名：The 10th JSOL International
Symposium on Solanaceae Genomics
JSOL2013.
発表年月日：2013 年 10 月 29 日～10 月 30 日
発表場所：Osaka Prefecture University,
Osaka, Japan

11. 発表者名：加藤一幾、石上由佳、山田瑛
理、尾上美咲、立澤文見
発表標題：中性植物トマトの花成制御機構に
おける SP5G 遺伝子の機能解析.
学会等名：第 31 回日本植物細胞分子生物学
会（札幌）大会・シンポジウム.
発表年月日：2013 年 9 月 10 日～9 月 12 日
発表場所：北海道大学高等教育推進機構、北
海道札幌市

〔その他〕
ホームページ等
<http://tsukuba-olericulture.org>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

有泉 亨 (ARIIZUMI, Tohru)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：70575381

王 寧 (WANG, Ning)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：90730193
(平成 26 年度より分担研究者)

加藤 一幾 (KATO, Kazuhisa)
岩手大学・農学部・准教授
研究者番号：30613517

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

棚瀬 京子 (TANASE, Kyoko)
岡部 佳弘 (OKABE, Yoshihiro)
市野 琢爾 (ICHINO, Takuji)