

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2016～2020

課題番号：16H02534

研究課題名（和文）尻腐れ果の発生機構の解明と克服のための統合的アプローチ

研究課題名（英文）An integrated approach for elucidation of the mechanism of blossom-end rot occurrence and overcoming it

研究代表者

金山 喜則（Kanayama, Yoshinori）

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10233868

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 30,900,000円

研究成果の概要（和文）：トマトの尻腐れ果は甚大な被害を及ぼす生理障害であるが、その発生機構は十分に解明されていない。そこで本研究では、安定的に尻腐れ耐性を示す染色体断片置換システムを材料とした遺伝学的アプローチ、カルシウムを含む全てのイオンを網羅的に解析できるイオノームとカルシウムの動態を明らかにするための解析アプローチ、さらにオミクスと遺伝子発現制御によるエビデンスの獲得するためのアプローチを統合することにより、尻腐れ果の発生機構を解明するとともに、克服のための育種素材を提供することを目的とした基盤的研究をおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題で対象としたトマトは世界および日本で最も生産されている野菜であり、人々の健康増進に大きく寄与している。しかし環境変動に脆弱で、容易に尻腐れという生理障害が発生し、収量が半減してしまう。そこで、この障害の克服のため、野生種の遺伝子を利用することのできる特色ある材料と網羅的解析など先端的アプローチによって課題解決のための成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Blossom end rot in tomato fruit is a physiological disorder that causes enormous damage in the world and Japan, and its mechanism of occurrence has not been fully elucidated. Therefore, in this project, a genetic approach using chromosomal fragment substitution lines that stably show resistance to blossom end rot was performed with ionomic analysis of all ions containing calcium and analysis to clarify the dynamics of calcium. Furthermore, transcriptome analysis and the regulation of gene expression were performed to obtain the evidence. Through these approaches, we conducted basic research aimed at elucidating the mechanism of occurrence of blossom end rot and providing breeding materials for overcoming it.

研究分野：園芸学

キーワード：トマト 尻腐れ果 生理障害

1. 研究開始当初の背景

トマトは日本では卸売価額第1位(農林水産省)、世界でも生産量第1位(FAOSTAT)の最も重要な野菜である。現在も世界的な生産は伸びているため生産地域の拡大が期待されているが、環境ストレスへの脆弱さがその拡大を制限している。環境ストレスにより顕在化する被害で最も顕著な症状が尻腐れ果の発生であり、その損失は収量のかかなりの割合を占める。日本においても、従来からの高温期の被害に加えて、近年の水分ストレスの付与による高糖度栽培が発生を助長しているため、解決すべき課題としての重要度は増している。

尻腐れ果の発生が Ca^{2+} と関わることは知られているが、必ずしも施肥量と発生率が比例するとは限らず、 Ca^{2+} 施与量が十分でも発生する場合があることが知られており、発生機構の解明には至っていない(Uozumiら, 2012)。従来の研究では、養液栽培や高糖度栽培など種々の栽培条件下で発生が観察されているが、その多くは尻腐れ果の発生状況と Ca^{2+} 含量の把握にとどまっている。また、 Ca^{2+} 輸送に関わる遺伝子の発現調節が尻腐れ果の発生に影響を及ぼすことも知られているが、 Ca^{2+} の動態が極端にかく乱されているため通常の発生機構の解釈には至っていない(Tonetto de Freitasら, 2011)。

被害が甚大であるにもかかわらず、現在まで十分な機構解明が行われてこなかった要因としては、適切な遺伝学的解析のための材料がないことや、イオン、代謝物、遺伝子の解析範囲が限定的でオミクス解析が活用されていないこと等があげられる(Ho・White, 2005)

2. 研究の目的

新たな手法を組み合わせるために必要な研究組織を構築し、本研究を実施した。特に、安定的に尻腐れ耐性を示す染色体断片置換系統(IL系統)を材料とした遺伝学的アプローチ、 Ca^{2+} を含む全てのイオンを網羅的に解析できるイオノーム等のオミクス解析や Ca^{2+} の動態を明らかにできるイメージングによるアプローチ等によるエビデンスを獲得するとともに、克服のための育種素材を提供することを目的とした。

3. 研究の方法

尻腐れ耐性を示すIL系統および耐性遺伝子付近の組換え系統を用いて、原因遺伝子候補や関連するメカニズムについて検討した。迅速で網羅的なイオン分析が可能なイオノーム解析を取り入れ、全てのイオンの動態と尻腐れ果発生との相関を検討した。また、局在性を可視化し、尻腐れ果発生に直接関係すると考えられる Ca^{2+} の動態を明らかにする手法を試行するとともに、関連する遺伝子の発現解析の網羅性を高めて尻腐れ果発生機構解明の一助とした。

4. 研究成果

尻腐れ果の症状は開花15日までの果実発育初期に見られることから、開花11日~15日の間の果実を対象として種々の解析を行った。材料としてはトマトの栽培品種(*Solanum lycopersicum*)であるM82に対して尻腐れ果の発生率が低いIL8-3系統を用いた。IL8-3は、M82の染色体をバックグラウンドとして、第8染色体の一部に近縁野生種(*Solanum pennellii*)の染色体断片を置換させた系統である。

M82では全果実の約20%が尻腐れ果となったのに対し、IL8-3では尻腐れ果は発生しなかった。トマトの尻腐れ果の発生要因は果実中の Ca^{2+} 不足であると考えられていることから、果実他各器官の Ca^{2+} 含量を測定したところIL8-3の果実における Ca^{2+} 含量は、M82に比べて高かった。果実以外の器官では、葉においてIL8-3がM82に比べて多くの Ca^{2+} を含んでいた。したがってIL8-3の尻腐れ果の発生抑制は、果実における高い Ca^{2+} 含量が要因であるとともに、IL8-3の高い Ca^{2+} 蓄積能は葉と果実に共通することが明らかとなった。

尻腐れ果は、果実の肥大速度が最も高い時期の果頂部における Ca^{2+} の不足が要因となって発生するとの仮説があるので(De Freitasら, 2011; Ho・White, 2005)、尻腐れ果の発生時期の果実肥大速度をM82とIL8-3で比較した。果実の横径と縦径にもとづいた肥大速度において、M82はこの期間を通してIL8-3に比べて高い傾向がみられた。特に開花11~14日後のM82の肥大速度は、果実の横径と縦径とも有意に高かった。よって、IL8-3で尻腐れ果の発生が抑制される要因として、尻腐れ果の発生において重要な初期の果実肥大がM82に比べて緩やかで、果頂部における Ca^{2+} 不足が生じ難いことが考えられた。

尻腐れ果の発生機構を検討する上で、Cation exchanger (CAX) 等を含む Ca^{2+} の輸送に関わる遺伝子の解析は重要である。 Ca^{2+} /Cation antiporter (CaCA) スーパーファミリーは植物細胞における Ca^{2+} やカチオンの濃度制御およびそれらを通したホメオスタシスにおいて重要な役割を担っている。シロイヌナズナのCaCA配列を用いたBLAST検索により、トマトのゲノム上にCaCAは16個存在することが示唆された。予備的な系統樹解析の結果、16個のCaCAは4つのファミリーに分類され、CAXは6つ、 $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-like protein (NCL) は4つ、Cation/ Ca^{2+} exchangers (CCX) は5つ、 $\text{Mg}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger (MHX) は1つと考えられた。これらトマトCaCAがCaCA

としての機能を有しているか確かめるため、シーケンスで得られたアミノ酸配列を用いて TMHMM (version 2.0)、EMBL-EBI の InterPro でドメイン検索を行った。CaCA は膜を介してカチオンの対向輸送を行うため、膜貫通ドメイン (transmembrane domain, TM) が存在している。既報によると、CaCA には平均 10 個の TM が存在するとされている (Emery ら、2012 ; Pittman・Hirschi、2016 ; Taneja ら、2016)。トマト CaCA における TM 数は最小で 9、最大で 13、平均は約 10.9 であり、既報とおおむね一致した。

EMBL-EBI の InterPro でドメインを検索したところ、CaCA に特徴的な Na₂Ca₂ex ドメイン (Pfam ID、Pf01699 ; Taneja ら、2016) が、CAX、NCL、CCX、MHX には 2 つ存在して、その他、NCL にのみ EF-hand ドメイン (Pfam ID: PF13499) が存在していた。Taneja ら (2016) によると、パンコムギの CaCA は 2 つの Na₂Ca₂ex (Pfam ID: Pf01699) ドメインをもち、TaNCL のみ 1 つの EF-hand ドメイン (Pfam ID: PF13499) をもつ。トマト CaCA には重要なドメインが保存されていたことから、トマトのゲノム上には機能的な CaCA は 16 個存在すると結論付け、それぞれ SICAX、SINCL、SICCX、SIMHX として扱うこととした。

各 CaCA のゲノム構造を調べるため、得られたエクソンの配列と該当する遺伝子のゲノム DNA の配列から、エクソンとイントロンの模式図 (省略) を作成した。その結果トマトの CaCA には、バリエーションを有する遺伝子やイントロンレスの遺伝子 (CCX) が存在した。イントロンレスの遺伝子はスプライシングの過程を経ることなく翻訳され、ストレスに対して速やかに応答することができることとされていることから (Jeffares ら、2008)、CCX はストレス応答に関与する可能性が考えられた。

本研究で得られたトマトの CaCA およびイネ、シロイヌナズナの CaCA のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った。イネ、シロイヌナズナのアミノ酸配列は Emery ら、(2012) と Pittman・Hirschi (2016) を参照した。その結果、推定 CaCA の結果と同様に 16 個の CaCA は 4 つのファミリーを形成し、それぞれ CAX には 6 つ、NCL には 4 つ、CCX には 5 つ、MHX には 1 つの遺伝子が分類された。CAX はさらに Type 1A と Type 1B に分類された。Emery ら (2012) および Shigaki ら (2006) によると、Type 1A には植物、Type 2B には植物と蘚類の CAX が分類されることから、Type 1A と Type 1B が機能的な差異を有することが示唆されている。シロイヌナズナにおいては、CAX Type1B に属する AtCAX2 と AtCAX5 は Ca²⁺、Cd²⁺、Mn²⁺を含む様々なカチオンを輸送し (Edmond ら、2009 ; Hirschi ら、2000 ; Shigaki ら、2003)、Type1A に属する AtCAX1 と AtCAX3 は Ca²⁺に特異的であると考えられていた (Conn ら、2011 ; Shigaki ら、2003)。しかし、Type 1A CAX を酵母で発現させると数種のカチオンを輸送したため、Type 1A CAX も幅広いカチオン特異性をもつようである (Kamiya ら、2005 ; Mei ら、2009)。また、CCX は Group 1、Group 2、Group 3 に分類された。Emery ら (2012) によると、Group 1 には植物、藻類に加えて非植物が、Group 2 には植物と蘚類が、Group 3 には植物の CCX が分類される。Group 1 は Group 2、3 とはカチオン結合領域の配列が異なることから、カチオンの選択性が異なる可能性がある。

対向輸送体が細胞内でどのようにカチオン濃度を制御しているかを理解するために、細胞内局在を特定することは重要である。そこで、ProtComp で細胞内局在を予想した。その結果、SICAX は全て液胞に局在すると予想された。SINCL については局在を予想することはできなかった。SICCX のうち、Solyc01g098800 は細胞膜に局在すると予想されたが、その他はすべて液胞に局在すると予想された。AtCAX1、AtCAX2、AtMHX、OsCCX2 は液胞に局在すること (Hirschi ら、2000 ; Kamiya ら、2006 ; Shaul ら、1999 ; Yadav ら、2015)、Solyc01g098800 と同じ Group 1 に分類される AtCCX5 は細胞膜に局在することが実験的に確かめられているほか (Zhang ら、2011)、CaCA は液胞および細胞膜に存在するという報告があり (Singh ら、2015 ; Taneja ら、2016)、今回の局在予測結果はこれらの既報と一致していた。

CAX は主に液胞膜に存在し H⁺/Ca²⁺交換に重要である (Pittman、2011)。CAX は Ca²⁺以外のカチオンも輸送するため (Edmond ら、2009 ; Hirschi ら、2000 ; Kamiya ら、2005 ; Mei ら、2009 ; Shigaki ら、2003 ; Shigaki ら、2005)、H⁺/Ca²⁺ではなく H⁺/Cation 輸送体と呼ばれている。CAX は塩ストレスに応答するが (Kamiya ら、2005 ; Shigaki・Hirschi、2006 ; Taneja ら、2016)、発現誘導・抑制のパターンはメンバーによって異なる。また、細胞質の Ca²⁺濃度が高まると CAX の発現が高まる (Lee ら、2013)。さらに、CAX 遺伝子の発現が他の CaCA 遺伝子より高いことが他の植物種で報告されている (Kamiya ら、2005 ; Singh ら、2015 ; Taneja ら、2016 ; Mei ら、2009)。CAX は様々なカチオンを輸送することができるため、CaCA の中でも特に重要な役割を果たしている可能性がある。NCL は Na⁺と Ca²⁺を対向輸送する (Emery ら、2012)。塩ストレスや高温ストレス、アブシシン酸によって発現が誘導され (Singh ら、2015 ; Taneja ら、2016)、オーキシンによって抑制される (Li ら、2016)。しかしシロイヌナズナにおいて NCL を過剰発現させると耐塩性が低下し、ノックアウトすると耐塩性が向上することから (Wang ら、2012)、ストレス耐性との関係は単純ではない。CCX は液胞膜あるいは細胞膜に局在する (Morris ら、2008 ; Zhang ら、2011)。シロイヌナズナにおいて、AtCCX3 は H⁺/K⁺、Na⁺対向輸送を (Morris ら、2008)、AtCCX5 は K⁺の取り込みを行う (Zhang ら、2011)。CCX は塩ストレスによって発現が誘導されるが、CCX による K⁺の細胞内への取り込みまたは Na⁺の隔離が耐塩性に関与すると考えられている (Morris ら、2008a ; Singh ら、2015 ; Taneja ら、2016 ; Zhang ら、2011)。MHX は H⁺/Mg²⁺対向輸送体である。シロイヌナズナの AtMHX は液胞に局在し、Mg²⁺に加えて Zn²⁺、Fe²⁺も輸送する (Shaul ら、1999)。パンコムギの TaMHX は塩ストレス、高温ストレス、乾燥ストレスで発現

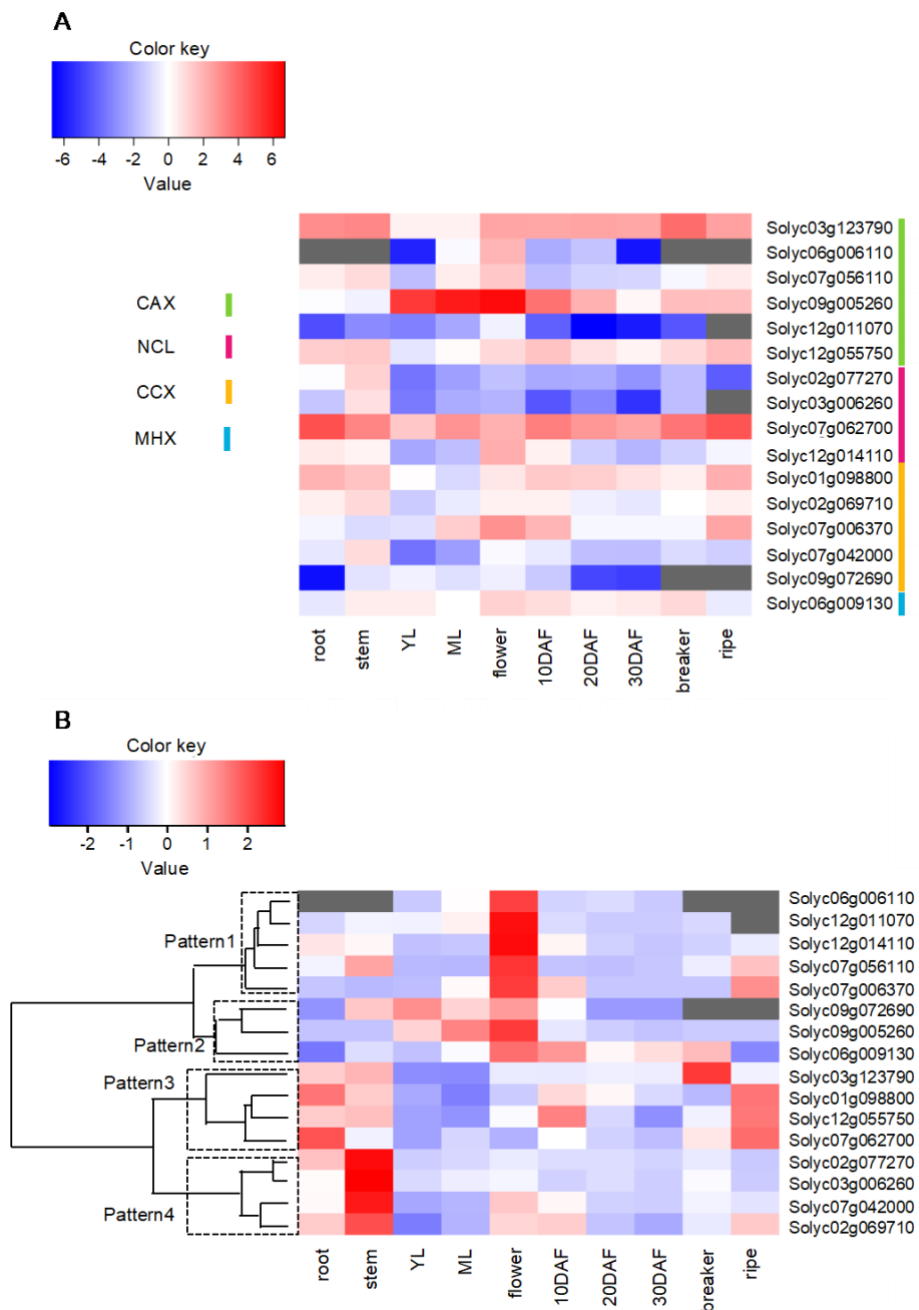
が抑制されたが (Taneja ら、2016)、イネの OsMHX では同様の条件下において発現が上昇しており (Singh ら、2015)、植物種によって非生物的ストレスへの応答が異なると考えられている。

発現解析の結果、器官や発育段階によって強く発現する遺伝子が異なることがわかった (図参照)。CAX Type 1B 遺伝子は、花以外の器官では茎で発現が高かった。一方 Type 1A 遺伝子は茎で発現が低いあるいは発現しておらず、グループ間で違いがみられた。また、パンコムギの TaCAX は子実や種子で高い発現を示すが (Taneja ら、2016)、トマトにおいては根あるいは花で高い発現を示した。SINCL である *Solyc07g062700* は特に根で最も高い発現を示したが、他の植物種においても *Solyc07g062700* と配列の共通性が高い NCL は根で高い発現を示した (Singh ら、2015 ; Taneja ら、2016)。CCX Group1 遺伝子 (*Solyc01g098800*) は葉以外で、Group 2 遺伝子 (*Solyc02g069710*, *Solyc07g042700*) は根で、Group 3 遺伝子は (*Solyc07g006370*, *Solyc09g072690*) は成葉、花、10DAF 果実で発現が高く、各グループ内で発現パターンが類似していた。MHX はクロロフィル合成に重要な Mg^{2+} を輸送するため茎や葉で発現が高いと考えられているが (Taneja ら、2016)、トマトにおいては茎、葉と同程度の発現が花および 10DAF~breaker の果実でみられた。植物体全体で発現が高かった遺伝子は SICAX では *Solyc09g005260*、SINCL では *Solyc07g062700*、SICCX では *Solyc07g006370* であり、それぞれのファミリーの中で中心的な役割を担っていることが考えられた。そこで、これら 3 つの遺伝子に着目した。

IL8-3 は M82 と比較して尻腐れ果の発生率が低いこと、およびトマトにおいてシロイヌナズナの CAX を過剰発現させると尻腐れ果の発生率が増加することが報告されている (De Freitas ら、2011)。そこで、IL8-3 における尻腐れ果の発生抑制と CaCA との関連を検討するため、IL8-3 における CaCA の発現を調べた。発現解析の結果、*Solyc09g005260* (SICAX) と *Solyc07g062700* (SINCL) の発現は、IL8-3 で低かった。*Solyc09g005260* (SICAX) と *Solyc07g062700* (SINCL) は液胞へ Ca^{2+} を輸送することから、IL8-3 は液胞への Ca^{2+} の輸送量が少ないことが考えられた。一部の CAX をノックアウトした場合には、細胞質からアポプラストへと Ca^{2+} を輸送する ACA (autoinhibited Ca^{2+} antiporter) の発現が上昇し、アポプラストの Ca^{2+} 濃度が上昇することが報告されている (Conn ら、2011)。よって、IL8-3 でも同様の現象が起こり、アポプラストの Ca^{2+} 濃度が高まっている可能性が考えられた。再現性の確認が不十分である部分もあるが、*Solyc09g005260* (SICAX) と *Solyc07g062700* (SINCL) の発現の違いが IL8-3 における尻腐れ果の発生抑制に関与する可能性が考えられた。

<引用文献>

- Conn ら. 2011. *Plant Cell* 23: 240–257.
Edmond ら. 2009. *Biochem. J.* 418: 145-154.
Hirschi ら. 2000. *Plant Physiol.* 124: 125-133.
Jeffares ら. 2008. *Trends Genet.* 24: 375-378
Lee ら. 2013. *Mol. Biol. Rep.* 40: 177-188
Mei ら. 2009. *New Phytol.* 183: 95-105
Pittman ら. 2016. *Rice* 9: 3.
Shigaki・Hirschi. 2006. *Plant Biol.* 8: 419-429.
Shaul ら. 1999. *EMBO J.* 18: 3973-3980.
Taneja ら. 2016. *Front. Plant Sci.* 7: 1775.
Yadav ら. 2015. *Sci. Rep.* 5: 17117.
Zhang ら. 2011. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414: 96-1.
Wang ら. 2012. *J. Biol. Chem.* 287(53): 44062-44070.
De Freitas ら. 2011. *Plant Physiol.* 156: 844-855.
Emery ら. 2012. *Front. Plant Sci.* 3: 1.
Ho・White. 2005. *Ann. Bot.* 95: 571-581.
Kamiya ら. 2006. *Plant Cell Physiol.* 47: 96-106.
Li ら. 2016. *Plant Cell Environ.* 39: 377-392.
Morris ら. 2008. *Plant Physiol.* 148: 1474-1486.
Shigaki ら. 2003. *J. Biol. Chem.* 278: 6610-6617.
Singh ら. 2015. *Rice* 8: 21.
Uozumi ら. 2012. *Sci. Hortic.* 138: 1-6.



Expression profile of *SiCaCA* superfamily genes in various organs containing fruit from 10 days after flowering (DAF) to ripeness. YL and ML represent young and mature leaves, respectively. (A) In order to accurately compare the expression levels between genes, the copy number corresponding to the amount of each mRNA was determined using the standard curve. The expression level was expressed as \log_2 , and the heat map was prepared by subtracting the expression level of each gene from the median; red represents the highest expression levels, white indicates median expression, and blue shows the lowest expression levels. Gray represents undetectable expression. Each \log_2 expression value was based on the mean of three biological replicates. (B) To compare the expression levels among organs for each gene, expression levels were normalized in each gene. Color bar denotes Z-score: red represents the highest expression levels, white indicates mean expression, and blue shows the lowest expression levels in each gene. Gray represents undetectable expression. Hierarchical clustering was performed using Ward's method. Each expression value was based on the mean of three biological replicates.

(研究成果に含まれる Amagaya・Kanayama ら 2020 (Plants 9, 25)の Fig. 4 を引用)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kayoko Amagaya; Tomoki Shibuya; Manabu Nishiyama; Kazuhisa Kato; Yoshinori Kanayama	4. 巻 9
2. 論文標題 Characterization and Expression Analysis of the Ca ²⁺ /Cation Antiporter Gene Family in Tomatoes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants9010025	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 Hiroki Ikeda, Tomoki Shibuya, Manabu Nishiyama, Yoshihiro Nakata and Yoshinori Kanayama	4. 巻 86
2. 論文標題 Physiological Mechanisms Accounting for the Lower Incidence of Blossom-end Rot in Tomato Introgression Line IL8-3 Fruit	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Horticulture Journal	6. 最初と最後の頁 327-333
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2503/hortj.OKD-015	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 Toshihiro Watanabe, Eriko Maejima, Tomoko Yoshimura, Masaru Urayama, Aiko Yamauchi, Masako Owadano, Ryosuke Okada, Mitsuru Osaki, Yoshinori Kanayama, and Takuro Shinano	4. 巻 11
2. 論文標題 The Ionomics Study of Vegetable Crops	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0160273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0160273	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 -

〔学会発表〕 計62件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 20件）

1. 発表者名 Kanayama, Y.
2. 発表標題 Physiological disorder and imaging in tomato
3. 学会等名 The 16th Japan Solanaceae Consortium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshihiro Watanabe, Ryota Tomizaki, Ryotaro Watanabe, Hayato Maruyama, Takuro Shinano, Yoshinori Kanayama.
2. 発表標題 The ionomic study of vegetable crops with emphasis on tomato
3. 学会等名 The 16th Japan Solanaceae Consortium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinori Kanayama
2. 発表標題 Studies on tomato introgression lines and Tohoku Univ. international program
3. 学会等名 Tohoku University-Russian Academy Joint Seminar on Education and Research in High-Tech for Plant Production (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2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	高橋 英樹 (Takahashi Hideki) (20197164)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	加藤 一幾 (Kato Kazuhisa) (30613517)	東北大学・農学研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	渡部 敏裕 (Watanabe Toshihiro) (60360939)	北海道大学・農学研究院・准教授 (10101)	

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
連携研究者	栗原 大輔 (Kurihara Daisuke) (90609439)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師 (13901)	

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