

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18633

研究課題名(和文) 受粉刺激を介した単為結果性果実発達の分子機構に関する研究

研究課題名(英文) Study on molecular mechanism of parthenocarpic fruit development via stimulation of pollination

研究代表者

岡部 佳弘 (OKABE, YOSHIHIRO)

筑波大学・生命環境系・客員研究員

研究者番号：30752951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、単為結果性を示す2種類のトマト変異体を用いて、変異体における種無し果実の形成がどのような制御機構で生じるのかを明らかにすること、ならびに1系統の新規変異体の原因遺伝子を同定することを目的とした。変異体解析の結果、1系統の変異体において、種無し果実の形成が植物体のフラボノイド欠損により生じる栄養器官の発達と関連して、起こることが分かった。新規変異体の解析においては、原因遺伝子が新規遺伝子である可能性が示唆された。これらの変異体の解析により、単為結果性と果実発達を制御する分子機構に関する新たな知見を得ることができるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で単離した新たな単為結果性育種素材は、単為結果性に関する研究材料としてだけでなく、品種育成に向けた育種素材としての利用が期待される。果実発達研究のモデルとして利用されているトマトにおける単為結果性の分子機構を解明することにより、それらの知見をピーマンやメロン等の果菜類における着果率向上、応用することが可能である。また、新しい制御因子を利用した高収量品種の育種や環境変動に伴う夏期の高温下での収量性改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated how parthenocarpic fruit set is occurred in two tomato mutants and identification of the responsible gene in a new mutant, to clarify the regulatory mechanism of parthenocarpic fruit set in tomato. Phenotype analysis indicated that seedless fruit is produced in association with vegetative growth caused by flavonoid deficiency. In another mutant, the result suggested that the responsible gene is a novel gene which controls parthenocarpic fruit set.

研究分野：農学

キーワード：果実発達 トマト 単為結果性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

単為結果は、受粉・受精によらず、着果および果実（子房）の肥大が起こる現象である（図1）。果菜類の育種、園芸分野においては種子なし果実の作成や着果安定のために、単為結果性を品種に付与することは、果実の品質向上と安定な栽培に重要であり、大幅な省力化と経費削減につながる事が期待される。これまでトマト品種には遺伝的に単為結果性を示す品種が古くから知られており、栽培種との交配により、これらの遺伝形質(*pat-2* 遺伝子)を栽培品種に導入する試みが行われ、その結果、単為結果性トマト‘ルネッサンス’、パルトなどの品種が育種されてきた。一方で、これらの品種は、果実品質の低下（果実軟化、裂果）、環境による着果率低下を伴うことから、不良形質を伴わない新たな遺伝資源、遺伝子座の同定が望まれている。近年、単為結果性の分子機構については明らかにされつつあるが、原因遺伝子の実体については依然としてその一部が明らかにされているにすぎない。従って、単為結果性果実発達の中核を成す分子ネットワークを解明することの意義は大きいといえる。

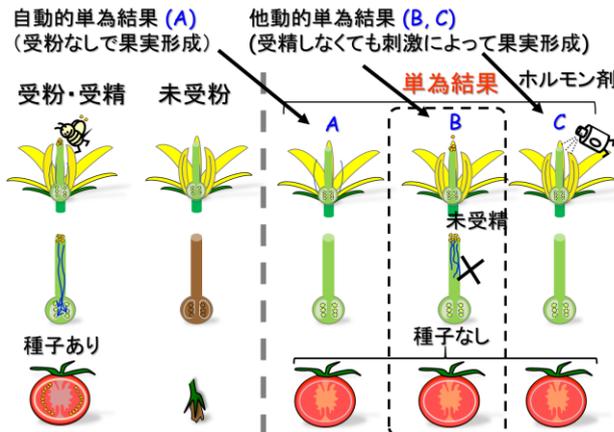


図1 単為結果性果実発達の分類

単為結果性果実発達は、主に自動的単為結果3つに大別される（図1）。単為結果の分子機構解明を目指したこれまでの研究においては、野生型の受粉あるいは未受粉（除雄）時の雌蕊（子房）と1：受粉非依存的な単為結果性変異体（図1A：自動的単為結果）、2：単為結果を誘導に關与する植物ホルモン（オーキシン、ジベレリン、サイトカイニン）や植物ホルモン作用阻害剤/促進剤（オーキシン作用阻害剤：PCIB，エチレン作用阻害剤：1-MCP，ジベレリン生合成阻害剤：PAC，サイトカイニン代謝阻害剤：CPPU）等を処理することによって生じる単為結果性（図1C：他動的単為結果）の雌蕊（子房）における遺伝子発現プロファイルを比較する研究

が主に行われてきた。また、これまでは遺伝子組換え技術を用いた過剰発現体や発現抑制体の作出により研究が多く、育種素材としての利用を念頭に置いた、突然変異体（非遺伝子組換え体）を利用したアプローチは少ない。

2. 研究の目的

申請者は、矮性トマト品種マイクロトムのEMS突然変異誘発系統（約10,000系統）から、遺伝学および逆遺伝学的手法により受粉・受精無しで果実が発達する単為結果性変異体のスクリーニングを行ってきた。これらのうち、特徴的な果実形成を示す変異体2系統に着目して形質の評価を実施した。

第1の変異体は、フラボノイド欠損表現型を示し、種無し果実を形成する *Slchs1*, *Slchs2* の二重変異体 (*Slchs1/Slchs2* 変異体) を用いた。第2の変異体としては、原因遺伝子が明らかとなっていない高い着果率を示す新たな単為結果性変異体 (変異体 A) を用いた。本研究では、上記の着果特性の異なる変異体を利用して、果実の着果を制御する新たな機構解明を目指すと共に、新規の単為結果性育種素材の開発につながる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、矮性トマト品種マイクロトムのEMS突然変異誘発系統から単離した2系統の単為結果性変異体を用いて、その特徴を詳細に把握するためにそれぞれの表現型観察を行った（課題1）。続いて、次世代シーケンサーにより、原因遺伝子が明らかとなっていない変異体 A のゲノムリシーケンセス解析を実施し、既知の単為結果性遺伝子内に変異が生じているか否かを確認した。さらに変異体 A と野生型を交配した F2 分離集団における連鎖解析を行い、原因遺伝子の特定を試みた。（課題2）。

（課題1）変異体の表現型観察

Slchs1/Slchs2 変異体、変異体 A の2系統をガラス温室またはグロースチャンバー内において栽培を行い、栄養器官ならびに果実の表現型、果実サイズ、収量性を野生型と比較した。

（課題2）変異体の原因遺伝子の探索

マイクロトムを遺伝的背景とする変異体 A の M3 世代ならびにマイクロトム野生型からゲノム DNA の抽出を行い、ゲノム DNA の精製を行った後、次世代シーケンサー Illumina HiSeq X に

より 30-40 Gb のデータ量を取得できるように解析を実施した。野生型と変異体間の多型を比較し、候補となる変異の抽出を行った。DNA を抽出した野生型個体と変異体 A を交配し、F2 分離集団の作出を行った。

4. 研究成果

(課題 1)

それぞれの変異体における植物体および果実の表現型観察を行った。

Slchs1/Slchs2 変異体

植物体全体のフラボノイドの欠損 (主にアントシアニン欠損) が観察された。茎および葉は、アントシアニンの欠損により、淡い緑色を示した。また、節間長の著しい短縮がみられた (図 2、図 3)。果実においては、ナリンゲニンカルコン (黄橙色) の減少に伴う果実色の変化がみられ、果皮、果肉が共にピンク色を示した。Slchs1/Slchs2 変異体表現型の強いアレルの組み合わせ (Slchs1-1/Slchs2-1, Slchs1/Slchs2-1) では、種子の形成が著しく阻害されており、果実からは種子が得られなかった (図 2)。弱い表現型を示すアレル (Slchs1-3/Slchs2-1) においては、種子形成は正常であり、果皮色については、野生型と強いアレルの中間的表現型を示した。種子の形成については、Slchs1-1 ならびに Slchs1-2 の単一アレルにおいても種子数の減少が見られたことから、Slchs1 が種子形成において重要であることが示唆された。以上の結果より、Slchs1/Slchs2 変異体の単為結果性は、フラボノイドの減少とそれに伴う栄養器官の発達と関連があると考えられた。

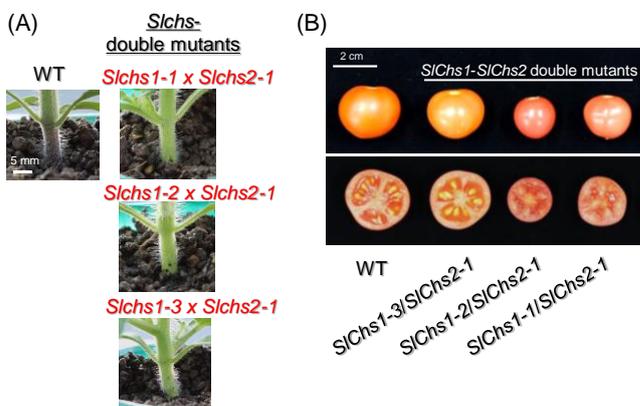


図 2. Slchs1/Slchs2 変異体の表現型 (茎、果実)

(A) 茎 (播種後 3 週間後)、(B) 果実の表現型 (赤熟期)。Slchs1/Slchs2 変異体の茎においてアントシアニンの欠損がみられた。果実において、ナリンゲニンカルコンの欠損によりピンク色の果実が形成された。

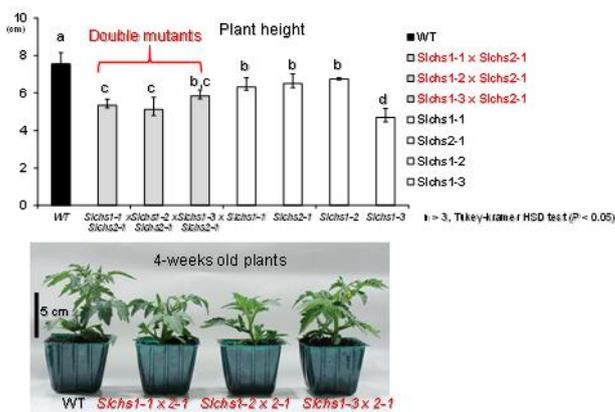


図 3. Slchs1/Slchs2 変異体の表現型 (植物体全体)

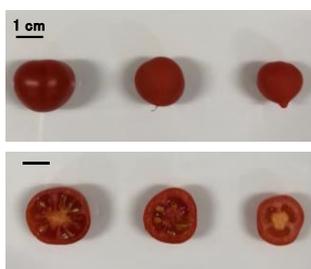
播種後 4 週間後の植物体の様子。Slchs1/Slchs2 変異体では節間の短縮がみられた。異なるアルファベットは、サンプル間に有意差があることを示す (Tukey-Kramer HSD test, $p < 0.05$)。

変異体 A

(課題 2)

新規の単為結果性変異体の単為結果性の評価をするために、グロースチャンパー内で栽培し、表現型の評価を行った。変異体 A は受粉無の条件下においても、8 割から 9 割の果実が着果し、高い着果率を示した。また、野生型と比較して、果実サイズは 3 割程度小さくなるが、株あたり

の収量は、1割程度の減少に留まった。この要因として、着果数が増加したことにより株あたりの全収量は、野生型の受粉処理区と同等になったと考えられた。変異体 A では、栽培の後半にかけて奇形果の発生率が若干増加することから、今後、形質を一般トマトの遺伝的背景にした際に同様の現象が観察されるかについて調査する必要があると考えられた。着果率については、これまで筑波大学で単離されている他の単為結果性変異体と比較しても、高い値を示しており、実用面での利用が期待される。



野生型 変異体A 変異体A
受粉有 受粉有 受粉無

図4. 変異体 A の表現型観察
(A) 果実の断面図

変異体 A の原因遺伝子を同定するために、マイクロトム野生型と変異体 A の全ゲノムリシーケンス解析を行った。トマト参照ゲノム (SL2.4) およびマイクロトム野生型ゲノムへのマッピングを行い、変異体に存在する SNV の抽出を行った。この結果、絞り込んだ領域内に存在する SNV の中で、アミノ酸置換が引き起こされた遺伝子群をリスト化した。はじめに、推定される遺伝子アノテーションに基づき、有力な候補遺伝子の選定を行った。選定された遺伝子の中には、既知の単為結果性遺伝子は抽出されなかったことから、変異体 A の原因遺伝子が新規の遺伝子である可能性が示唆された。F2 分離集団における、表現型の分離比が歪んでいることから、複数の遺伝子が関与している可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

① [Okabe Y](#), Yamaoka T, Ariizumi T, Ushijima K, Kojima M, Takebayashi Y, Sakakibara H, Kusano M, Shinozaki Y, Pulungan SI, Kubo Y, Nakano R, Ezura H. Aberrant Stamen Development is Associated with Parthenocarpic Fruit Set Through Up-Regulation of Gibberellin Biosynthesis in Tomato. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, Volume 60, Issue 1, January 2019, Pages 38–51, <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy184>

② Yano R, Hoshikawa K, [Okabe Y](#), Wang N, Pham TD, Pulungan SI, Shiba H, Ariizumi T, Ezura H. Multiplex exome sequencing reveals genome-wide frequency and distribution of mutations in the ‘Micro-Tom’ Targeting Induced Local Lesions in Genomes (TILLING) mutant library. *Plant Biotechnology*, 査読有, 2019 (in press).

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。