

令和元年6月25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：16K18648

研究課題名(和文) トマトの腋芽抑制遺伝子の発現と機能解明

研究課題名(英文) Development of Axillary Bud Affected by Dominant-negative Mutant Allele in Tomato

研究代表者

王寧(WANG, NING)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：90730193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トマト及び他の園芸作物の生産管理において腋芽摘みは果実の品質および収量へ影響する要因だが、大変労力のかかる作業である。腋芽成長を抑制した品種の育成は就農者の高齢化に伴う現代農業に有用と考えられる。申請者はトマトの腋芽成長が著しく抑制される突然変異系統を発見した。変異系統の花器形成や花房数に異常が見られず、果実の大きさが増大するなど、生産上に有利な形質を示した。そこで本研究では、トマトの腋芽成長抑制変異体を用いた原因遺伝子を単離し、その原因遺伝子の機能解析によってトマト腋芽発生・成長を制御する機構を解明を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナス科には極めて多様な植物が含まれ、食用、薬用、鑑賞用などとして人類に多く利用される。中でも、トマトは世界的に最も重要な園芸作物の一つであり、果実発達研究のモデル植物として、また商業的な利用を目指した重要な研究対象でもある。品種育成と共に作型と整枝法について様々な工夫が行われ、腋芽摘みや、摘心することによって果実は大きくなり、糖度も向上するため、品質および収量へ大きく影響する要因と言える。最も煩雑なのは腋芽摘出作業であり、その手間を省ける管理に適した品種の開発が期待される。腋芽成長を抑えることで労力軽減ができ、栽培効率を飛躍的に向上して生産性を高めることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：The axillary bud develops the axil of leaf and has the potential to form shoot or floral cluster. Pruning treatment can increase the size and quality of fruits in tomato cultivation, however, removing the growth point accompanies with derepressing axillary bud growth which require much workload to take care the branch formation. An axillary bud suppression mutant (*abs1*) was found from a comprehensive Micro-Tom EMS-mutant population. The *abs1* produced either vegetative shoots (stems and leaves) or reproductive shoots (flowers) with no observable abnormalities in specification of floral organs. The phenotype of significantly repressed axillary bud in the *abs1* mutant and F1 hybrid, implies that the *abs1* has a dominant-negative mutant allele of casual gene. Repression of axillary bud is potentially utilized for facilitation of tomato cultivation, and a dominant-negative mutant allele can easily reveal its impact in hybrid breeding that improves working efficiency.

研究分野：園芸

キーワード：腋芽 トマト ドミナントネガティブ 摘芯

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

園芸作物において品種育成と共に作型と整枝法について様々な工夫が行われて現在に至っている。整枝に関して腋芽摘みや、摘心することによって果実は大きくなり、糖度も向上するため、品質および収量へ大きく影響する要因と言える。故に、腋芽成長制御は安定した高品質食料供給に有効であり、重要な研究課題の一つである。中でも、最も煩雑なのは腋芽摘出作業であり、その手間を省ける管理に適した品種の開発が期待される。腋芽成長を抑えることで労力軽減ができ、栽培効率を飛躍的に向上して生産性を高めることが可能となる。多くの植物は主茎と側枝の区別が生じる単軸状分枝タイプだが、ナス科では主茎に花芽ができると主枝の伸びが止まり、腋芽が伸びて主枝に代わることを仮軸分枝タイプである。トマトの場合、数枚程度の本葉分化後に花芽が分化して、主茎の伸長は停止する。次にこの花房直下の腋芽が強く伸長し、三葉に一花房と言う単位で半永久的に成長を続ける無限花序である。そのため整枝はトマト栽培する中でとても大切な作業である。腋芽摘みは大変労力のかかる作業であり、放置すると養分を使ってしまい、結実に大きく影響する。また、腋芽を放っておくと葉が茂り過ぎて日当たりや風通しが悪くなり、病害虫の原因になる。腋芽摘みは腋芽が小さいうちにすると作業がしやすく、かつトマトの生育上のダメージも少ない。しかし、腋芽の成長が早く、見落としてしまうとすぐに主茎と競合するようになり(Y型)、草姿に大きく影響する。腋芽摘み、摘心の時に病気に接触した刃物や手によって伝染し、大きな損失をもたらす。

頂芽の生長が側芽の成長より優先される現象を頂芽優勢として知られている。摘心する際に、それまでに向かっていた同化養分は果実や腋芽に回されるが、頂芽を取り除くと側枝の成長が促進される。トマトにおける腋芽形成に関わる研究は乏しく、分子レベルの制御機構はまだ十分解明されていない。その中で、トマト腋芽形成能を失った突然変異体には *lateral suppressor (ls)*、*blind (bl)* 及び *torosa (to)* が知られている。*ls* 変異体の表現型は側芽の分裂組織形成が完全にブロックされ、腋芽がなくなる。また、遺伝子欠損によって花器形成、特に花卉形成しなくなり、稔性にも大きく影響する。近年の研究により、*ls* の原因遺伝子は植物特異的な GRAS ファミリーに属する転写因子をコードすることが明らかになった。GRAS ファミリーの遺伝子は植物ホルモンのシグナル伝達系に關与して成長と発達の制御、および共生細菌と植物の相互作用に關与している。一方、*bl* と *to* は対立遺伝子として知られており、MYB 遺伝子ファミリーの転写因子をコードする。*bl* 変異体は栄養生長期において腋芽の分裂組織形成は抑えられるが、生長に連れて第二から第五節に発生する。野生型の腋芽と比べ、生長が遅れて葉を一枚しか形成せず、花器形態が変化して花房数も著しく減少する。

2. 研究の目的

申請者は先行研究において筑波大学が所有するトマトのモデル品種マイクロトムの EMS 突然変異誘発系統 (NBRP) を用い、表現型から変異系統の選抜を行った。突然変異系統から腋芽成長が著しく抑制される形質を示す変異体 *axillary bud suppressor1 (abs1)* を発見した。*ls* 及び *bl* 変異体の表現型と比べて *abs1* 変異体は花器形成への影響は見られず、果実の大きさが増大し、生産上に有利な形質を示した。本研究では、トマトの重要な農業形質である草姿の発現制御メカニズム解明を目指し、マイクロトムバックグラウンドの腋芽成長抑制変異体を用いた原因遺伝子を単離し、その原因遺伝子の機能解析によってトマト腋芽発生・成長を制御する機構を解明するためである。更に、同定した遺伝子はマイクロトム(心止まり型)以外の遺伝背景を持つトマト(非心止まり

型)へ導入し、腋芽成長抑制効果を検証する。様々な遺伝背景を持つ材料を用いて腋芽形成・成長のメカニズムや、多様性進化や適応性分化の解明の手掛かりになり、将来的に実用化に向けた試みを確実に挙る。トマト及び他の園芸作物の生産管理において腋芽摘みは果実の品質および収量へ影響する要因だが、大変労力のかかる作業である。就農者の高齢化に伴う農業従事者の減少する中、本研究は栽培管理に手間や労働力を省くような品種改良に貢献することが十分に期待できる。

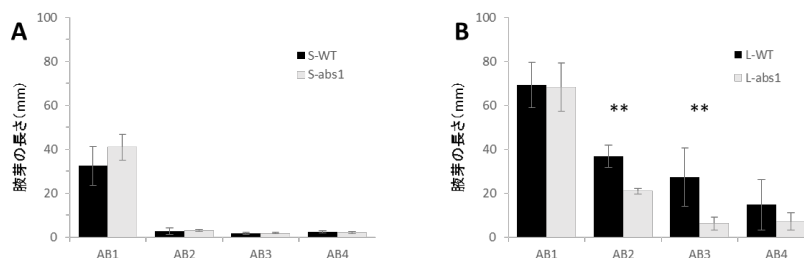
3. 研究の方法

本研究では、トマト腋芽成長が負に制御された変異体を用いてドミナントネガティブ作用を示す *abs1* の原因遺伝子を同定するため、最初に原因遺伝子マッピングを行う。野生型と変異系統を交配した個体を自殖して得られた F₂ 形質分離個体を用い、栽培条件の検討と表現型調査を行う。次世代シーケンサーを利用したゲノム配列解析によって変異体 *abs1* の全変異力所を調査し、全染色体を網羅する DNA マーカーを開発する。QTL 解析を行い、関与する遺伝子座の数とそれぞれの寄与率を評価した上で、最適な候補遺伝子座に対してファインマッピングを行う。組換え証拠に基づき、原因遺伝子の後方領域を確定し、機能する塩基置換を絞り込む。35S プロモーターで誘導する *ABS1* 過剰発現系統および、*RNAi* 法を用いた *ABS1* 発現抑制形質転換体を用いた機能解析を行い、特に栄養生長時期における *ABS1* の時期特異的な機能を検討する。更に、非心止まり型遺伝背景を持つ品種へ *abs1* アレルを導入して腋芽形成への影響を解明する。以上の研究から得られた情報に基づいて、トマト分枝性の形質発現を改良する技術を提案する。

4. 研究成果

4-1

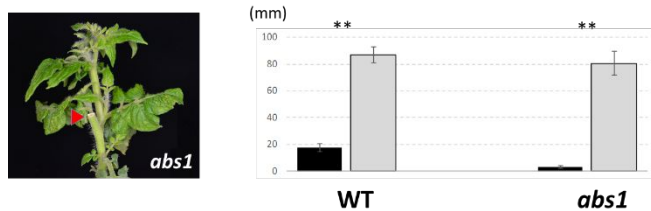
先行研究において、我々は農業上重要形質の腋芽成長抑制する新規変異体を発見した。変異系統および野生型と交配した F₁ 世代の表現型調査したところ、腋芽成長しない形質は F₁ 世代において完全優勢となり、活性がない(ネガティブ)変異型の遺伝子産物が正常型に対して優性(ドミナント)に働くドミナントネガティブ作用を示した。ドミナントネガティブ作用はレセプター等にホルモンシグナル伝達系において稀に見られる現象、正常型と変異型の遺伝子産物が共存するとき、変異型の性質が正常型を凌駕するために、正常型の表現型が打ち消されて見えなくなる変異と見られる。これまでに発見した腋芽変異体 (*ls* 及び *bl*) を示す表現型はいずれも F₁ 世代において劣勢であり、本研究に用いる研究材料と異なる表現型を示した。故に、申請者はトマトの新しい腋芽形成機能を失った突然変異体と考えられる。腋芽成長は栽培環境によって大きく変動する。マイクロトム野生型は個体差の少ない遺伝的に均一な状態であるはずだが、供試個体の間に観察した腋芽サイズのばらつきが大きかった。F₂ 形質分離個体の表現型を調査する際に生じる誤差を最小限に抑えるため、比較的表現型の違いが表れやすい栽培条件を探索することにした。検討したところ、野生型は照度、温度または根系の発達に影響を受けやすいことが分かった。一方で、*abs1*



変異型は比較的安定した表現型を表し、栽培条件によって腋芽サイズの変動が少なかった。特に、腋芽の成長に根系の発達具合は大きく関与することが分かった。

4-2

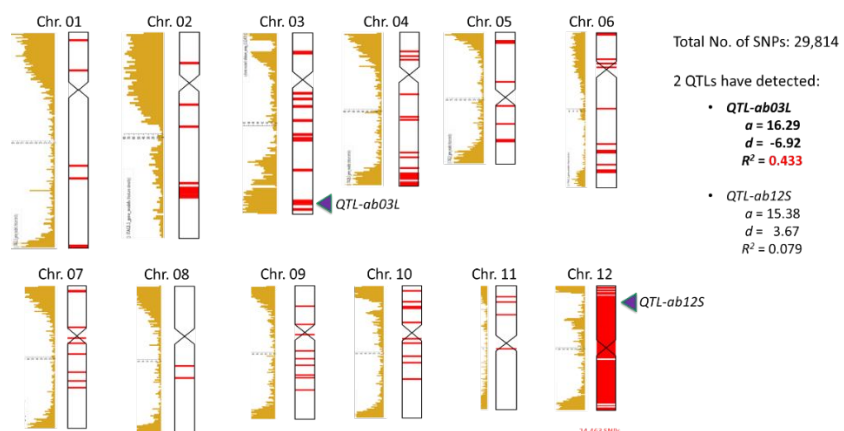
頂芽優勢は、茎頂部で生合成され基部に移動する植物ホルモンのオーキシンによる、側芽の成長に必要なサイトカイニンの合成抑制と、ストリゴラクトンの合成促進によっておこると考えられている。茎頂部を切除すると、基部に移行するオーキシン量が低下するので、サイトカイニンの合成が促進されると共にストリゴラクトンの合成が抑制された結果、腋芽が成長する。播種後約 4 週間、開花期し始めた時期の変異体 *abs1* および野生型に対し摘芯を行い、さらに 2 週間栽培した後に腋芽の成長状況を調べた。その結果、摘芯した変異体 *abs1* の腋芽が大きく成長でき、第二腋芽サイズを指標となる場合は野生型との間に有意差がなかった。このことから、摘芯することにより生長点に生成されたオーキシンの供給が中断され、サイトカイニンの生合成が向上した原因と考えられる。更に、野生型と比べ、摘芯しない変異体 *abs1* には頂芽の抑制効果が強く、オーキシンがより多く生成されたところと考えられる。



The 2nd Axillary bud (AB2) length after decapitation

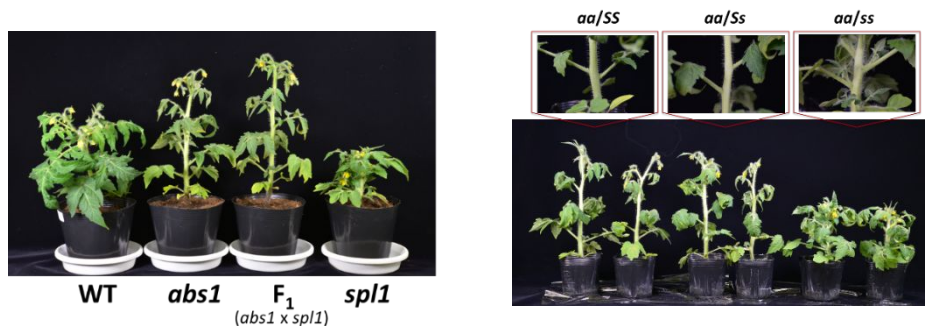
4-3

変異体 *abs1* 及び野生型の全ゲノムリシーケンシングを行った。SNPs 全体の 9 割が集中する 12 番染色体に対して全染色体をカバーするように DNA マーカーを作成し、その他の染色体に短腕と長腕にアンカーマーカーを作成した。作製したマーカーは全ての染色体、特に EMS 処理で誘導された SNPs が集中している場所は全て網羅できる。しかし、脇芽の形質は栽培環境の変化に大きく左右される。より確かな結果を求めるために F₂ 個体を複数回栽培を行い、QTL 解析の結果を比較した。その結果、12 番染色体に寄与率が 0.7% のマイナー-QTL、3 番染色体の長腕に表現型と有意に相関する遺伝子座を発見した。更に、3 番染色体長腕のアンカーマーカー周辺に多数の DNA マーカーを設計した。QTL 解析を行った結果、寄与率が 43% のメジャー-QTL を発見した。3 番染色体長腕の候補領域を詳細に解析した結果、核膜孔構成タンパク質をコードする遺伝子にミスセンス変異が挿入されていることを明らかにした。ファインマッピングなどを行い、表現型と候補遺伝子の遺伝型の相関を再度確認した上で機能解析へと進めている。



また、遺伝学において、異なる遺伝子座間の相互作用が一つの形質に影響することはエピスタシスと呼ばれる。一つの遺伝子座 (modifier gene) の遺伝子型が、別の遺伝子座の遺伝子型の表現型に影響するあらゆる種類の相互作用である。表現型が現れる方の遺伝子の状態を上位(epistatic)、表現型が取り替えられる、あるいは、抑制される方の遺伝子の状態を下位(hypostatic、ハイポスタティック)と呼ぶ。

abs1 と相反表現型を示す脇芽が大きく生長できる変異体 *Shot Pedicle Length 1(SPL1)*を発見した。*spl1* は単一劣勢遺伝子に支配され、一方で *abs1* が WT と交配した際に変異型が優性を示したので、*spl1* と *abs1* 変異体はそれぞれ異なる遺伝子によって支配されていると考えられる。*spl1* と *abs1* を交配した二重変異体において、*spl1* アレルはヘテロ接合体の場合は、*abs1* アレルをホモ接合またはヘテロ接合を持つ個体が *abs1* の表現型を示し、脇芽の成長抑制が観察された。一方で、両遺伝子ともに変異アレルがホモ接合の場合は脇芽が大きく成長する *spl1* の表現型が完全優勢として現れた。ことから、*SPL1* は *ABS1* の上流に位置すると考えられる。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Ning Wang, Xiaolei Wang, Ryoichi Yano, Katsuki Nada, Hiroshi Ezura and Miyako Kusano (2017) Formation and Subsequent Development of Axillary Bud Affected by Dominant-negative Mutant Allele in Micro-Tom. XIV Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference. Sep 3-6, 2017, Valencia, Spain.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：矢野亮一

ローマ字氏名：Ryoichi Yano

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。