

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03761

研究課題名（和文）トマトにおける細胞質雄性不稔性回復遺伝子同定による効率的F1採種系の確立

研究課題名（英文）Establishment of an efficient F1 breeding system based on cytoplasmic male sterility in tomato

研究代表者

有泉 亨 (Ariizumi, Tohru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70575381

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はトマトの細胞質雄性不稔性（CMS）の稔性回復遺伝子（RF）の同定を目的とした。まず、2つの稔性回復系統の高精度のゲノム配列を構築した。稔性回復に寄与する主要な遺伝子座を同定し、DNAマーカーを開発した。また、*Solanum pimpinellifolium*と*S.l.cerasiforme*に由来するRF遺伝子は同一遺伝子座に座乗することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RF遺伝子の座乗領域を特定でき、稔性回復と強度に連鎖するDNAマーカーの開発に至った。この結果、迅速にRF遺伝子座が導入された花粉親の開発が可能である。現在、CMSを利用したF1採種システムはトマトで開発されていないが、このDNAマーカーを活用することで、高純度の種子生産が可能なF1採種システムの開発に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify fertility restoring genes (RFs) for cytoplasmic male sterility (CMS) in tomato. First, we constructed a highly accurate genome sequence of two fertility restoration lines. The major loci contributing to fertility restoration were identified and DNA markers were developed. We also found that the RF genes from *Solanum pimpinellifolium* and *S.l.cerasiforme* are loci for the same locus.

研究分野：園芸科学

キーワード：トマト 細胞質雄性不稔性 花粉 F1種子採種 ミトコンドリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞質雄性不稔性 (Cytoplasmic Male Sterility) は核と細胞質の遺伝子産物の不親和によって正常な花粉が産生されない現象である。CMS の原因因子は細胞質のミトコンドリアゲノムにコードされる、通称「S」と呼ばれるタンパク質である。CMS は多くの作物で雑種第一代 (F1) 採種の際に利用されるが、トマトでは CMS の採種システムは未だに構築されていない。また、CMS トマトの稔性を回復させる稔性回復 (RF) 遺伝子も未だに同定されていない。一方、その RF 遺伝子を保有する稔性回復系統が存在することが知られている。しかし、トマトでは未だに RF 遺伝子は同定されていない。また、S 遺伝子においては通常、隣接する遺伝子とのキメラ遺伝子として存在する例が多く報告されているが、CMS トマトの S 遺伝子は同定されていない。

## 2. 研究の目的

本提案は CMS トマトの花粉稔性を回復させる RF 遺伝子を同定すること、また、ミトコンドリアゲノムに S 遺伝子を同定することを目的とした。RF 遺伝子が同定されることで、その DNA マーカー化が可能になり、CMS を利用した効率的な採種システムが構築されると期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料の整備と稔性回復様式の調査

ジャガイモの野生種である *Solanum acaule* と栽培種トマトの非対称性融合から作出された CMS トマトを利用した。また CMS トマトの稔性回復系統である *S. pimpinellifolium*、*S. lycopersicum var. cerasiforme* と CMS トマトと交雑した F1 個体、これを自殖した F2 集団、並びに F1 個体に栽培品種トマトを交配した BC1F1 集団を作出し、本研究で利用した。稔性回復様式を調べるために、F2 集団と BC1F1 集団を育成した。

### (2) 稔性回復系統のゲノム配列構築

稔性回復系統のゲノム配列を構築するために、ロングリードシーケンサーSequel を利用してゲノム配列情報を取得した。まず、アセンブルして contig を取得後、illumina から得られたショートリードでエラー補正した。エラー補正した contig は既存の栽培種トマトゲノム (バージョン SL4.0) に対して整列させて各染色体に相当するスキファールドを獲得した。ゲノム情報と RNA-Seq リードを活用して遺伝子予測を行い、RNA-Seq リードをマッピングして発現遺伝子を同定した。

### (3) RF 遺伝子座乗領域の特定

BC1F1 集団を育成し、稔性がある個体とない個体を果実内の種子の有無、花粉発芽の有無の両方の評価で決定した。花粉発芽は自家受粉させた後に柱頭をアニリンブルー染色し、花粉管の有無を調査した。その次に、稔性がある個体とない個体をそれぞれプールにした DNA を調整し、第二世代シーケンサーでゲノム配列情報を取得した。このゲノム情報を利用して QTL-Seq 解析を行い、稔性回復遺伝子の座乗領域を特定した。

#### (4) S 遺伝子候補の同定

維持系統、CMS 系統のミトコンドリアゲノムを構築するために、ロングリードシーケンサーから取得したシーケンスリードを活用してミトコンドリアゲノムを構築した。その後、RNA-Seq リードを取得して *de novo assembly* による遺伝子構造の推定を行った。その後 CMS 系統特異的に存在する ORF を探索した。また、ゲノム配列から ORF を予測し、CMS 系統特異的に存在する ORF の探索も実施した。次に、得られた S 遺伝子の候補において、RT-PCR を行なって花粉発芽時に発現している候補を選抜した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 材料の整備と稔性回復様式の調査

まず、CMS 系統の雄性器官の特徴づけを行った。葯の異なる発達段階のパラフィン切片の観察より、CMS 系統と維持系統では形態的にはほぼ差が見られないものの、CMS 系統のタペト層の分解が開始される時期が若干遅れていることが分かった。しかし、その後のタペト層の分解や成熟花粉の大きさ、あるいは表面構造は維持系統の花粉と差がなかった。一方、アニリンブルー染色で受粉後の花粉管伸長を観察したところ、維持系統とは異なり CMS 系統の花粉は一切発芽していなかった。そのため、花粉発芽不能に起因する雄性不稔性であることが分かった (図 1)。次に F2 集団を育成したところ、384 個体中 379 個体が稔性回復を示した。一方、BC1F1 個体では可稔と不稔がほぼ 1:1 に分離した。このことから RF 遺伝子の稔性回復様式は配偶体であると考えられた。F2 集団での 5 個体の不稔は雑種不稔に起因すると考えられた。

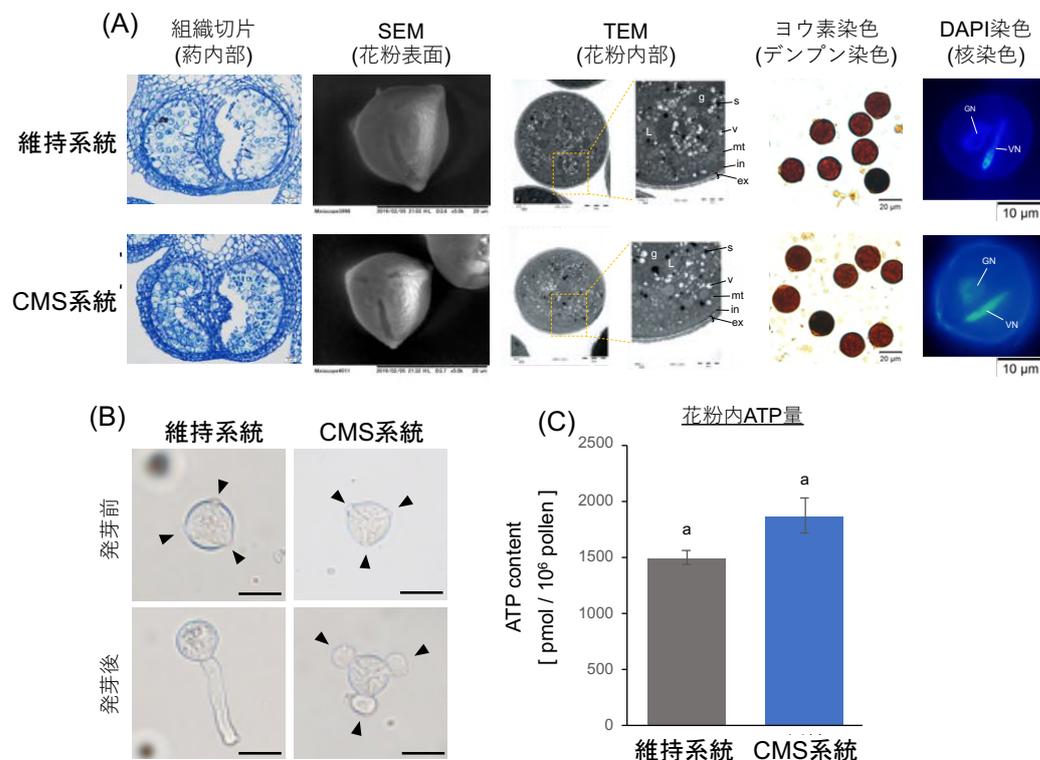


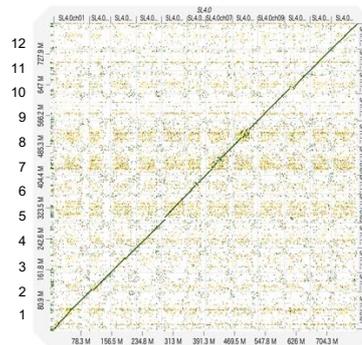
図1. CMS系統の花粉の形態観察およびATP合成量

(A)CMS系統と維持系統において、葯の内部構造、外観、内部構造、デンプン蓄積並びに核を染めるDAPI染色実験を比較した。いずれにおいても両者で差は見られなかった。(B)花粉発芽時の形態。CMS系統は3つの花粉孔が膨らむ異常があった。(C)維持系統とCMS系統におけるATP合成量の比較。両者で差は見られなかった。

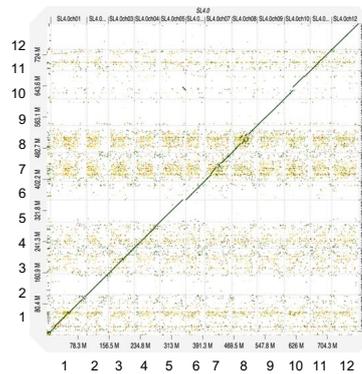
## (2) 稔性回復系統のゲノム配列構築

2つの稔性回復系統の全ゲノム配列を構築するために、まずロングリードシーケンサーゲノムが未解読であった新しいアクセッション‘LA1670’*S.pimpinellifolium* および‘LA1673’の*S.lycopersicum* var. *cerasiform* の配列情報を Pac Bio Sequel から取得し、ゲノムアセンブリを行なった。それぞれ、合計 86.7 Gb のロングリードをアセンブルし、トマトの参照配列‘Heinz1706 SL4.0’のおよそ91%以上をカバーする244のコンティグ(‘LA1670’)、および202のコンティグ(‘LA1673’)を得た。illumina のショートリードでエラー補正を行い、補正後のコンティグを‘Heinz1706 SL4.0’に対して整列させたところ、いずれも栽培種とのゲノム構造の高い類似性を確認できた(図2)。次に、ゲノム情報から遺伝子情報のアノテーションを行い遺伝子予測を行ったところ、それぞれ71945個、74870個のORFが推測された。異なる組織や発達段階の葯器官等から抽出した17のサンプルを利用してRNAシーケンス解析を行い、これらの発現を調査したところ、それぞれ29629、29185遺伝子の発現が確認された。

(縦軸)  
*S.pimpinellifolium*  
の各染色体番号



(縦軸)  
*S.l.cerasiforme*  
の各染色体番号



(横軸) トマト栽培品種 ‘Heinz1706’ (通称SL4.0) の各染色体番号

図2.稔性回復系統*S.pimpinellifolium* (A) と*S.l.cerasiforme* (B) のトマト参照配列 (SL4.0) に対するのdot plot解析。ゲノム構造はトマト参照配列と比べてほぼ一致しており、高精度のゲノムが構築できた。

## (3) RF 遺伝子座乗領域の特定

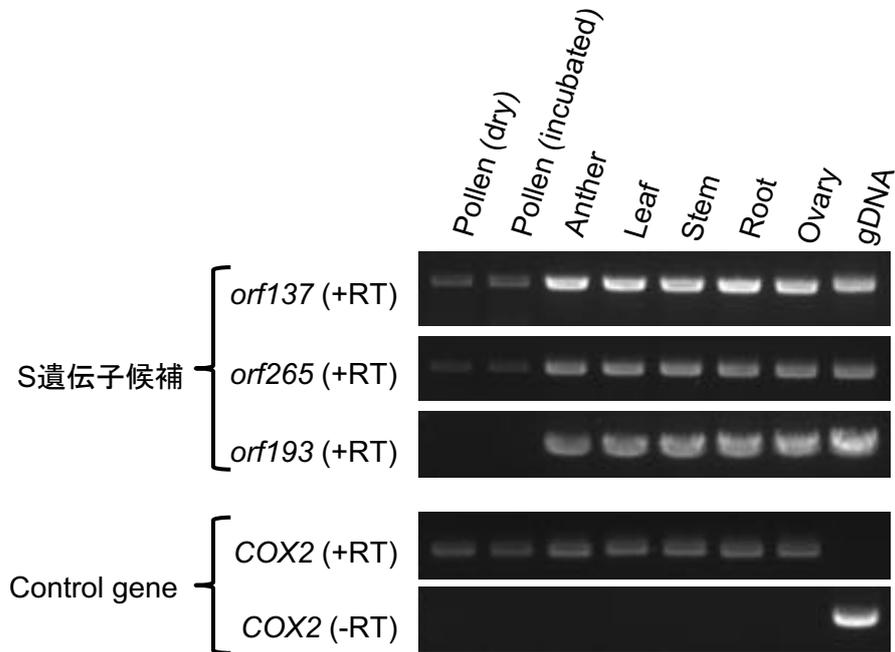
RF 遺伝子座がヘテロと、ヌルの個体が出現する BC1F1 集団を再度育成し、表現型の調査と RAD-Seq 法によるジェノタイピングを実施し、加えて QTL-Seq 法による RF 原因遺伝子座の同定を試みた。表現型の分離の調査では、花粉稔性が回復した個体と回復しない集団が 120:80 に分離し、1:1 に近い割合で観察された。この結果より、RF 遺伝子座が配偶体型であることがわかった。RAD-Seq により得られた SNP 情報をもとにアレル頻度を計算したところ、おおよそ 10Mbp 以内の領域で RF の候補となり得る領域を同定した QTL-Seq 解析でも同様の領域が見出されたことから、RF 遺伝子はこの領域に存在すると考えられた。まずはこの領域内で RF 系統にしか存在しない遺伝子を選抜したところ、1つの遺伝子が見出された。この遺伝子の全長をクローニングして CMS 系統に導入したが、稔性の回復を確認できなかった。

次に、この領域内に存在する PPR 遺伝子について調査した。その結果 RF の候補となり得る、花粉で発現する PPR 遺伝子が存在していた。そのうち、RF 系統と栽培種の間でアミノ酸配列の変化を伴う 4 つの遺伝子変異が存在した。うち、一つの PPR 遺伝子において相補性検定を開始した。

上記の一方、RF 候補領域が全て維持系統型の個体で稔性回復した個体も見出された。このことから、稔性回復に主要に寄与する遺伝子が存在する一方、稔性回復させる何か別の因子も存在すると考えられた。

#### (4) S 遺伝子候補の同定

CMS 系統と維持系統において、Sequel で生成したロングリードをアッセンブリーすることでミトコンドリアゲノムの構築を試みた。遺伝子予測を行ったところ、CMS 系統で特異的に発現する3つの候補を得ることができた。このうち、2つの遺伝子が花粉で発現していた (図3)。



**図3. S遺伝子候補のRT-PCRの結果**

CMS系統の花粉や各組織のcDNAを利用してPCRを行った結果、ORF137とORF265は花粉で発現していたが、ORF193は花粉で発現していなかった。RT-PCRのControlとして、ミトコンドリアのCOX2遺伝子を増幅した。gDNAはゲノムDNA。Pollen dryは開花時直後の花粉、Pollen incubatedは花粉発芽培地で培養した花粉からRNAを単離し、cDNAを合成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takei Hitomi, Shirasawa Kenta, Kuwabara Kosuke, Toyoda Atsushi, Matsuzawa Yuma, Iioka Shinji, Ariizumi Tohru	4. 巻 28
2. 論文標題 De novo genome assembly of two tomato ancestors, <i>Solanum pimpinellifolium</i> and <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> , by long-read sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 dsaa029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsaa029	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 白澤健太、桑原康介、原田竜成、武井瞳、壹岐友里恵、Vann Sockmean、松澤佑馬、飯岡真司、有泉亨
2. 発表標題 非対称細胞融合により創出されたトマトのオルガネラゲノムの構造解析
3. 学会等名 第137回 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武井瞳、白澤健太、桑原康介、松澤佑馬、飯岡真司、有泉亨
2. 発表標題 de novo assemblyによる2種の野生種トマトの参照ゲノム配列構築
3. 学会等名 第137回 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 壹岐友理恵、武井瞳、有泉亨
2. 発表標題 RF遺伝子を有する野生種トマト2種の葯における遺伝子プロファイリング
3. 学会等名 第139回日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武井瞳、白澤健太、桑原康介、松澤佑馬、飯岡真司、有泉亨
2. 発表標題 2種の野生種トマトの参照ゲノム配列構築
3. 学会等名 第139回日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 桑原康介、原田若成、松澤佑馬、飯岡真司、白澤健太、有泉亨
2. 発表標題 細胞質雄性不稔性トマトは花粉発芽時特異的に形態異常を示す
3. 学会等名 第139回日本育種学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takei H, Shirasawa K, Kuwabara K, Matsuzawa Y, Iioka S, Ariizumi T
2. 発表標題 Attempt of <i>S. pimpinellifolium</i> reference genome construction by de novo assembly.
3. 学会等名 Attempt of <i>S. pimpinellifolium</i> reference genome construction by de novo assembly. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takei H, Shirasawa K, Kuwabara K, Matsuzawa Y, Iioka S, Ariizumi T
2. 発表標題 野生種トマト <i>S.pimpinellifolium</i> と <i>S.lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> のゲノムアセンブリ
3. 学会等名 Japanese Solanaceae Conference (JSOL2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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	矢野 亮一  (Yano Ryoichi)  (00443044)	筑波大学・生命環境系・助教   (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
---------	---------