

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23672

研究課題名(和文) 果実における内部組織発達メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular dissection of fruit internal tissue development

研究代表者

篠崎 良仁 (Shinozaki, Yoshihito)

東京農工大学・学内共同利用施設等・特任助教

研究者番号：60841971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまでほとんど明らかとなっていない果実内部組織の発達を制御する機構の解明を目的とし、トマト果実をモデルとしてその発達に関連した遺伝子および代謝産物の探索を行った。これまでに候補として同定していた20遺伝子を対象にゲノム編集を利用したスクリーニング機能解析を行なった結果、TALEファミリーに属する転写因子をコードした遺伝子が内部組織の発達へ関与することを明らかにした。また、果実内部組織の発達抑制を示す変異体を利用したイメージング質量分析を行なった結果、トマト果実内部組織の発達とリンゴ酸蓄積との関係が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果実は食生活・食文化において欠かすことのできない作物であり、ヒトの嗜好性や健康に寄与する様々な有用成分の供給源となっている。本研究では、様々な有用成分を多く蓄積することが知られるトマト果実内部のゼリー組織に着目し、その発達に関連した遺伝子や代謝産物を明らかにした。本研究の成果は、様々な用途に応じた果実構造のデザインや、果実成分の蓄積場所として特定組織量の増大を可能とする新たな分子育種技術の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：The regulatory mechanisms for the development of fruit internal tissues have not been well understood. To unveil this, we analyzed genes and metabolites potentially associated with internal tissue development of tomato fruit, as a model material. A CRISPR screening for previously identified 20 candidate genes revealed that a TALE family transcription factor gene is involved in the development of fruit internal tissue. A mass spectrometry imaging analysis using a mutant showing deficient growth of fruit internal tissues suggested that malic acid accumulation is associated with the internal tissue development in tomato fruit.

研究分野：植物分子育種

キーワード：果実発達 トマト ゲノム編集 CRISPRスクリーニング イメージング質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

果実は食生活・食文化において欠かすことのできない作物であり、ヒトの嗜好性や健康に寄与する様々な有用成分の供給源となっている。果実に含まれる有用成分は作物種によって多様性に富んでいるが、蓄積する果実組織に特異性を示すものも多い。

世界で最も生産されている果実であるトマトは、その社会的重要性などから、果実の発達機構に関する研究モデルとして広く用いられている。トマト果実は特徴的な有用成分として、血圧降下作用を示すガンマアミノ酪酸 (GABA) や、強いうま味を呈するグルタミン酸、抗酸化作用を示すビタミン E などを果実内部のゼリー組織に多く蓄積することが知られている。今日、こうした有用成分を増加させ、生産果実の経済的および健康的価値を高めるニーズは非常に高い。また、特にトマト果実ではゼリー組織がもたらす食味や品質、さらに種子生産性への影響の大きさから、生食、加工、種苗などの用途に応じた果実構造が求められている。こうした社会的需要が存在する一方で、果実組織の発達機構に関する知見は未だに乏しく、その解明は作物における果実構造のより自由なデザインや、様々な果実成分の蓄積プールとして任意組織量の増大を可能とする新たな分子育種技術の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでほとんど知見が得られていない果実内部組織の発達を制御する機構の解明を目的とし、トマト果実の発達過程において一部がゼリー状組織へと分化する胎座を中心とした内部組織の発達に関連した遺伝子 (課題 1) および代謝産物 (課題 2) の探索を行った。遺伝子については、転写制御において重要な役割を担う転写因子をコードする遺伝子に着目した。また、代謝産物については、活発な組織発達に必要なエネルギー代謝に関連する中心炭素代謝産物に着目した。

3. 研究の方法

本研究では、トマト矮性実験品種マイクロトムを植物材料として以下の 2 課題を実施した。

課題 1: 果実内部組織の発達に関連した転写因子の探索

これまでの研究により同定した、肥大期の果実内部組織で特異的な高発現を示す遺伝子群から、20 種類の転写因子遺伝子 CL01-20 を選抜した。スクリーニング効率を高めるため、20 遺伝子のうち 4 つずつを同時標的とした CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集ベクターのプールを作製してマイクロトムに導入した。得られた形質転換体個体それぞれで導入されたベクターを同定し、標的遺伝子の編集および内部組織の発達を中心に果実形質の評価を行なった。

課題 2: 果実内部組織の発達に関連した分布を示す中心炭素代謝産物の探索

トマト *pro* 変異体は恒常的なジベレリン応答性を示し、受粉を必要としない単為結果性の果実形成を生じる。*pro* 変異体の単為結果果実では、受粉による果実形成と比べて果実内部の胎座組織の発達が強く抑制され、ゼリー量が減少することが知られていた。そこで、マイクロトムを遺伝的背景とする野生型および *pro* 変異体の形成初期果実 (開花 4 日後) を材料としたイメージング質量分析 (MALDI-MSI) を行い、内部組織の発達と関連した中心炭素代謝産物を探索した。

4. 研究成果

課題 1: 果実内部組織の発達に関連した転写因子の探索

作製した 5 種類のゲノム編集ベクターのいずれかが導入された 4 から 12 系統の T0 世代植物体が計 37 系統得られた。それぞれのベクター導入系統から 2 系統ずつ T1 世代植物体を 5-10 個体栽培し、各個体の葉から抽出した DNA を用いてサンガーシーケンシングによる標的遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、20 種類すべての標的遺伝子について何らかの変異が導入されたゲノム編集体を得られた。そのうち 18 種類についてはフレームシフト変異による推定上のノックアウト個体を得られたが、2 種類の bHLH ファミリー転写因子をコードする遺伝子については、3 塩基のインフレーム変異導入個体のみが得られた。

編集が確認された T1 世代個体について形質評価を行なったところ、特筆すべき変異形質として、野生型で横長であった果実形態が縦長に変化した 4 個体が特定のベクター導入系統から得られた (図 1)。

標的遺伝子				果実形質
CL05	CL06	CL07	CL08	
個体#1			1-bp 挿入	正常
個体#2	165-bp 欠失		66-bp 欠失	正常
個体#3	3-bp 欠失		618-bp 欠失	縦長
個体#4	3-bp 欠失		618-bp 欠失	縦長
個体#5	3-bp 欠失		42-bp 欠失	正常
個体#6			618-bp 欠失	縦長
個体#7			618-bp 欠失	縦長

野生型 (ヘテロ含む)	フレームシフト変異	インフレーム変異	不明瞭
-------------	-----------	----------	-----

図1 CL05-08の4遺伝子を標的としたCRISPR-Cas9ベクターが導入された系統の7個体における標的遺伝子の配列変異パターンおよび果実形質。サンガーシーケンシングの結果、異なるパターンのフレームシフトをヘテロで有すると推定されたものはフレームシフト変異に含めた。

標的4遺伝子の変異パターンを個体間で比較したところ、CL08遺伝子における618-bpの欠失が果実形態変異と関連していた(図1)。CL08は果実肥大初期の内部組織で特異的発現を示すTALEファミリー転写因子をコードする遺伝子であり(図2A)、形態変異を示した果実では開花20日後果実および赤熟果実において内部組織の発達抑制がみられた(図2B)。

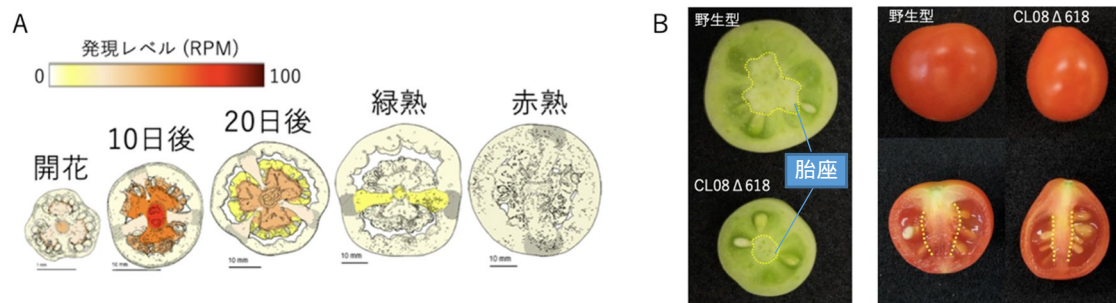


図2 トマト果実におけるCL08遺伝子の発現パターン(A)およびCL08遺伝子618-bp欠失変異体(CL08 Δ618)の開花20日後果実(B左)と赤熟果実(B右)における内外組織形態。

果実形質の変異がCL08の単独変異によるものであるかを明らかにするため、CL08単独変異体の単離を行なった。まず、図1に示した個体#7と野生型との交雑により得た植物体を栽培し、そのうちCRISPR-Cas9コンストラクト非導入個体について自殖種子を得た。得られた次代60個体を栽培し、13個体のCL08変異個体を単離した。これら13個体はすべて果実変異形質を示した。さらに、13個体それぞれでCL05-07の配列決定を行なった結果、CL08単独変異体を含む変異パターンが得られ、CL08変異のみで果実形態の変化が生じることが確認された。さらに、果実組織別トランスクリプトームデータの再解析を行なったところ、同遺伝子は推定上のパラログやタンパク質間相互作用パートナーとともに時空間的に強固な共発現ネットワークを形成しており、トマト果実内部組織の発達制御を担う可能性のある分子群が明らかとなった。

興味深いことに、CL08の1-bp挿入による推定上のノックアウト変異個体では果実の変異形質がみられなかったことから、上記共発現ホモログを候補とした機能重複遺伝子の存在が示唆された。これに対し、618-bp欠失によるインフレーム変異が生じた個体では、DNA結合やタンパク質相互作用に関わるドメインが残され、一定の機能を示す短縮タンパク質が翻訳されている可能性が既存の知見から考えられた。これらを証明するため、複数のフレームシフト型変異パターンの影響や、共発現ホモログ遺伝子の機能解析、618-bp欠失が推定上のパートナーとのタンパク質間相互作用に及ぼす影響などについて解析を進めている。

トマト果実における胎座組織の発達と関連した分布を示す中心炭素代謝産物を明らかにすることを目的とし、野生型の受粉果実および *pro* 変異体の単為結果果実について、形成初期を対象としたイメージング質量分析を行った。その結果、野生型と *pro* 変異体の間で多くの中心炭素代謝産物の組織局在性が一致した。一方でこれらの系統間で異なる分布が観察された分子例として、活発な細胞分裂を伴って大きく発達した野生型の胎座組織では、TCA 回路の基質の一つであるリンゴ酸 ($m/z=133.0$, $[M-H]^-$) について比較的高い蓄積がみられたのに対し、発達が弱い *pro* 変異体の胎座組織ではみられなかった。

トマト果実発達とリンゴ酸の関連性については、肥大期の果実胎座組織でリンゴ酸輸送に關与する遺伝子の特異的発現や、赤熟果実においてリンゴ酸は胎座組織に多く蓄積していることが報告されている (Shinozaki et al., 2018 Nat Commun; Chamley et al., 2019 Metabolites)。本研究の結果、果実発達初期における胎座発達とリンゴ酸蓄積との関連性が新たに示された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shinozaki Y., Beauvoit B.P., Takahara M., Hao S., Ezura K., Andrieu M.-H., Nishida K., Mori K., Suzuki Y., Kuhara S., Enomoto H., Kusano M., Fukushima A., Mori T., Kojima M., Kobayashi M., Sakakibara H., Saito K., Ohtani Y., Benard C., Prodhomme D., Gibon Y., Ezura H., Ariizumi T.	4. 巻 117
2. 論文標題 Fruit setting rewires central metabolism via gibberellin cascades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23970 ~ 23981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2011859117	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 篠崎良仁, 江面健太郎, 西田敬二, 森一樹, 久原哲, 鈴木穰, 榎元廣文, 草野都, 福島敦史, 森哲哉, 江面浩, 有泉亨
2. 発表標題 マルチオミクス解析を利用したトマト着果における糖代謝制御を担う遺伝子の同定
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020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

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		
フランス	University of Bordeaux	INRAE	