

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380021

研究課題名(和文) トマト草型制御因子の解析 - 発現量的形質遺伝子座解析の受光態勢研究への利用 -

研究課題名(英文) QTL analysis for factors controlling plant architecture in tomato: Use of eQTL for studying light capture efficiency of plants

研究代表者

杉山 信男 (SUGIYAMA, Nobuo)

東京農業大学・農学部・教授

研究者番号：30012040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,000,000円、(間接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トマトの受光態勢や収量に大きな影響を及ぼすと考えられる草型に関わる量的形質遺伝子座(QTL)を検出した。草冠サイズに関わるQTLは葉長、下垂角度に関わるQTLと同一の領域にクラスター状に検出され、草冠サイズは下垂角度や葉長の影響を受けていることが明らかになった。また、地上部窒素濃度、硝酸トランスポーター、葉長のQTLも同一の領域に検出されたことから、窒素の体内での分布パターンが葉の成長に影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Quantitative trait loci (QTL) for plant architecture, which could have a large impact on light capture efficiency and yield, were detected in tomatoes. Of these QTLs, QTL for canopy size was clustered with QTLs for leaf length and drooping angle. Therefore, it is likely that the canopy size is dependent on both leaf size and leaf drooping angle. Furthermore, QTLs for shoot nitrogen concentration and leaf length were co-located with expression QTL (eQTL) for nitrate transporter. This suggested that nitrogen distribution within plants affects leaf development.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、園芸学・造園学

キーワード：園芸学 ゲノム 定量PCR eQTL

1. 研究開始当初の背景

穂重型から穂数型へと草型を改良することによってイネの収量は飛躍的に増加した。穂数型の品種が多収になる理由として、穂数型品種は葉が直立し、また窒素施用量を増加しても葉面積が拡大しにくいために群落の下層まで光がよく届くこと、さらに短稈であるため倒伏しにくいことなどが挙げられている。これらの生理的・形態的な研究成果を踏まえ、イネでは草型の制御、特に短稈化や受光態勢の改良が育種における重要な目標の一つとなってきた。しかし、受光態勢が重要なのはイネ科作物に限ったことではない。トマトでは、節間の長い品種が収量の多い傾向にあるとされているが、これは節間が短いと下葉が上葉の陰に隠れることが関係していると思われる。Higashide と Heuvelink (2009) は1950年から2000年に育成されたオランダのトマト8品種を同一条件下で栽培し、近年育成された品種ほど葉の光合成速度が高いだけでなく、下層の葉に到達する光も多く、その結果、乾物生産量や収量が多くなることを明らかにしている。

Feng ら (2008) は、トマトの草型の遺伝について調べ、草型に関連する形質(出葉角度、植物体の横方向への広がり、葉の垂れ具合)は量的遺伝子の支配を受けていることを明らかにした。また Feng ら (2010) は房どりトマトを葉が立性のもと垂れるものとに分け、立性の品種の方が光利用効率の高いことを明らかにしている。近年トマトの収量性の向上が問題になっているが、受光態勢の改善を主目的にした育種は行われておらず、草型育種の基礎となる受光態勢関連形質に関する量的形質遺伝子座(QTL)も明らかにされていない。

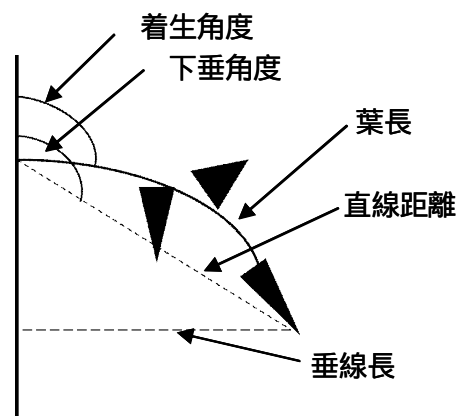
2. 研究の目的

本研究の目的の一つは、トマト草型を決定する量的形質遺伝子座(QTL)を明らかにすることである。しかし、草型関連形質の発現は栽培の季節や窒素施肥量によって影響を受けることが考えられるので、栽培季節を変えるとともに窒素施肥量を変えた実験も行い、主効果だけでなく栽培季節や窒素施肥によって発現が異なるQTL(QTL × 環境交互作用)を明らかにする。目的の第二は、RNA-seq解析と定量PCRとを利用し、窒素施肥によって発現量が変化する量的形質遺伝子座(eQTL)を同定し、草型を制御している候補遺伝子を明らかにして、草型に影響を及ぼす生理・生態的要因を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 草型に関わる QTL の検出

葉の下垂角度、節間長、分枝数、葉の大きさ、草冠の広がりなど、草型に影響を及ぼすと予想される形質について、トマトの栽培種 *Solanum lycopersicum* 'M570018' と近縁野生種 (*Solanum pimpinellifolium*) との戻し交雑自殖系統群 BC₁F₈ の111系統を両親とともに春と秋に栽培してQTL解析を行った。春の実験では第3花房まで、秋の実験では第2花房まで栽培を行い、それぞれ播種後70日と69日に最大葉と第1花房葉について第1図に示す項目を測定した。最大葉と花房葉について、それらの葉と上下各1枚、計3枚の葉の垂線長の平均値を求め、それぞれを最大葉と花房葉における草冠サイズとした。



第1図 測定項目

反復は1ポット1反復と考え、5反復し、QTL解析にはQTLNetworkを用いた。連鎖地図はBC₁F₇の111系統からDNAを抽出し、162マーカーを用いた多型解析によって得られた遺伝情報を基にMAPMAKER/EXP ver. 3.0bによって作成した。

(2) 窒素施肥反応に関わる QTL の検出

戻し交雑自殖系統群BC₁F₈の111系統を両親とともに窒素施用濃度を224ppmと22.4ppmに変えて初夏と秋にロックウール栽培し、初夏は処理後18日目、秋は25日目に草丈、葉数、最大葉長、地上部重、地上部窒素濃度を測定した。1ポット1反復と考え、5反復し、QTLNetworkを用いて解析した。

(3) 窒素代謝に関わる QTL 解析

窒素施肥量を変えて両親系統を栽培し、窒素施用濃度を224ppmと22.4ppmに変えて秋に栽培した。各処理区から本葉3~4枚が展開した幼植物3個体を選び、各個体の完全展開直前の葉から約100mgの葉切片を切り取った。処理ごとにサンプルをまとめ、液体窒素で凍結粉砕し、全RNAを抽出後、HiSeq2000(Illumina)によるペアエン

ドのシーケンス解析を行った。各サンプルあたり3Gb以上 約4000万リードの塩基配列データを決定し、Cufflinks 出力から得られる転写物のアセンブリデータのblastx 検索を行ってアノテーションを付与した。その結果、栽培種では窒素施肥に反応して転写物量が大きく上昇するが、近縁野生種では低窒素でも転写産物量が高く維持される遺伝子群が認められ、このクラスターには第3染色体に座乗するグルタミン酸合成酵素、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、硝酸トランスポーターの遺伝子が含まれることが明らかになった。そこで、このDNA部分配列をプローブにして、春に窒素施用濃度を224ppmと22.4ppmに変えてロックウール栽培した戻し交雑自殖系統群111系統について定量PCRを行い、Ct値を求め、QTLNetworkを用いてQTL解析を行った。

4. 研究成果

(1) 草型に関わる QTL の検出

トマトの草冠は単純な円筒型ではなく、部位によって横方向の広がりには差があると思われるので、本実験では、花房葉と最大葉のそれぞれについて、受光態勢に関連すると思われる葉の着生角度と下垂角度、屈曲程度（葉長/葉の直線距離）、葉の大きさ、横方向の広がり（草冠サイズ）などを調べた。また、実験を行った時期を環境要因と見なして QTL Network で QTL 解析を行った。その結果、14 の形質について、相加効果を示す QTL が 23、エピスタシスを示す QTL が 10 検出されたが、環境（実験を行った時期）との交互作用を示す QTL は検出されなかった。

葉長に関わる QTL が第 1、3 染色体に検出された。このうち、第 3 染色体上の花房葉長と最大葉長の QTL は同じ領域に検出され、どちらも栽培種由来の対立遺伝子が葉長を大きくする方向に働いていたので、同一の QTL が花房葉、最大葉両方の葉長に影響を及ぼしていると考えられた。

第 2 染色体に検出された花房葉と最大葉の草冠サイズに関わる QTL、第 12 染色体に検出された花房葉と最大葉の草冠サイズに関わる QTL はどちらも同じ領域に検出され、第 2 染色体では栽培種の対立遺伝子が草冠サイズを小さくし、第 12 染色体では大きくする方向に働いていたので、同一の QTL が花房葉、最大葉、いずれの部位で見ても葉の水平方向への広がり（草冠サイズ）に影響を及ぼしていると考えられた。

下垂角度に関わる QTL が第 2、12 染色体に、着生角度に関する QTL が第 10 染色体に、草冠サ

イズに関わる QTL が第 2、12 染色体に検出された。第 2 染色体に検出された下垂角度に関わる QTL は栽培種の対立遺伝子が下垂角度を大きくし、第 12 染色体に検出された下垂角度に関わる QTL は下垂角度を小さくする方向に働いた。また、第 2 染色体と第 12 染色体のほぼ同じ領域に草冠サイズ、下垂角度に関する QTL が検出されたことから、葉の水平方向への広がり（草冠サイズ）は下垂角度の影響を受けていると考えられた。また、第 3 染色体の花房葉長と最大葉長に関わる QTL が座乗している部位には草冠サイズに関わるエピスタシス QTL が検出されたので、草冠サイズには下垂角度だけでなく、葉の大きさも関与していると考えられた。

草丈に関わる QTL が第 2、3、4、6 染色体に、全葉数に関わる QTL が第 1、3 染色体に、節間長に関わる QTL が第 4 染色体に検出された。第 3 染色体に検出された草丈に関わる QTL と全葉数に関わる QTL は同じ領域に検出され、ともに栽培種の対立遺伝子が草丈と全葉数を小さくする方向に働いた。一方、第 4 染色体に検出された草丈に関わる QTL と節間長に関わる QTL は同じ領域に検出され、ともに栽培種の対立遺伝子が草丈と節間長を小さくする方向に働いたことから、これらの QTL は多面発現して草丈を制御している可能性が考えられた。

以上、葉の下垂角度、葉の大きさ、水平方向への広がり、草丈など、草型に影響を及ぼすと考えられる QTL を検出することができたが、これらの QTL が群落状態のトマトの受光量にどのような影響を及ぼしているのかについては部分置換系統を用いて検討する必要がある。そこで、現在、BC₂F₁ の 31 系統の中から、第 3 または第 12 染色体の草冠サイズに関わる QTL を含む領域に近縁野生種の染色体断片を持つ系統を選抜し、その自殖系統の中からこの QTL 領域が近縁野生種ホモになった系統を選抜している。今後、この系統を用いて受光量に及ぼす QTL の効果を調べる予定である。

(2) 窒素施肥反応に関わる QTL の検出

QTL 解析の結果、最大葉長、地上部新鮮重、乾物重、地上部窒素濃度の 4 形質について、相加効果を示す QTL が 14 個検出された。最大葉長に関わる QTL は第 2 染色体、第 3 染色体に 1 つずつ検出された。第 2 染色体の QTL は初夏、秋の実験のいずれにおいても安定的に検出され、栽培種の対立遺伝子が葉長を小さくする方向に働いた。一方、第 3 染色体に検出された QTL は初夏の実験のみで検出され、栽培種の対立遺伝子が葉長を大きくする方向に働いた。新鮮重に

関わる QTL は第 2 染色体に 2 つ、第 8、9、10、11、12 染色体に 1 つずつ検出された。第 2 染色体に検出された QTL はいずれも栽培種の対立遺伝子が新鮮重を小さくする方向に働いたが、他の QTL は栽培種の対立遺伝子が新鮮重を大きくする方向に働いた。第 9 染色体に検出された QTL だけは初夏、秋いずれの実験でも安定的に検出された。これら新鮮重に関わる QTL のうち、初夏の実験で検出された第 2、8、10、12 染色体の QTL と秋の実験で検出された第 9 染色体の QTL は窒素施用濃度との間に交互作用が認められ、高窒素条件下で栽培種の対立遺伝子 (QTL) の効果がより顕著になり、野生種の対立遺伝子 (QTL) の効果は弱められた。乾物重に関わる QTL は 3 つ検出された。このうち、第 1、2 染色体に検出された QTL は栽培種の対立遺伝子が乾物重を小さくする方向に働き、第 10 染色体に検出された QTL は乾物重を大きくする方向に働いた。また、第 1、10 染色体に検出された QTL は窒素施用濃度との間に交互作用が認められ、高窒素条件下で栽培種の対立遺伝子 (QTL) の効果がより顕著になり、野生種の対立遺伝子 (QTL) の効果は弱められた。地上部窒素濃度に関わる QTL は第 2、3 染色体に 1 つずつ検出された。

第 2 染色体に検出された最大葉長、新鮮重、乾物重、窒素濃度に関わる QTL はいずれもマーカー C2_At1g30580 近傍にクラスター状に座乗し、窒素濃度を除き、栽培種の対立遺伝子がこれら形質値を小さくする方向に働いていたので、同一遺伝子が多面的に発現している可能性が考えられた。第 10 染色体に検出された新鮮重と乾物重に関わる QTL も SSR301-SSR248 近傍にクラスター状に座乗し、野生種の対立遺伝子がこれら形質値を小さくする方向に働いており、窒素施用濃度との交互作用により高窒素条件下で QTL の効果が弱められた。以上、第 10 染色体に検出された新鮮重、乾物重に関わる QTL が野生種型になると、高窒素条件下でも新鮮重や乾物重の増加が抑えられることが明らかになり、窒素施用濃度を高めても過繁茂しにくい品種の育成にこれらの QTL を利用できる可能性があると考えられた。

(3) 窒素代謝に関わる QTL 解析

合計 37,779 の転写物が推定され、それらのうち、いずれかの処理間組み合わせで発現量に有意差が認められた転写物が 681 種類あった。これらの転写物について、MBCluster.Seq により FPKM 値に基づき 12 クラスターに分類したところ、栽培種では低窒素施肥に対して大きく反応して発現が低下するが、*S. pimpinellifolium*

では発現量がほとんど変わらないクラスターに分類された転写物が 97 種あった。そこで全トランスクリプトームの配列情報とアノテーション情報を blast2go に取り込み、この 97 種の転写物を含むクラスターについて gene set enrichment analysis を行ったところ、グルタミン酸代謝および硝酸輸送に関わる GO が有意に多く含まれた。このグルタミン酸代謝の GO に含まれる遺伝子は、グルタミン合成酵素のふたつのスプライシングバリエーションと、グルタミン酸デカルボキシラーゼ様遺伝子であった。これらはいずれも第 3 染色体上に座乗していた。

そこで、硝酸トランスポーター、グルタミン酸合成酵素、グルタミン酸デカルボキシラーゼの遺伝子特異的プライマーを作成し、窒素施用濃度を変えて栽培した戻し交配自殖系統について定量 PCR を行った。Ct 値を測定して eQTL 解析を行った結果、硝酸トランスポーター遺伝子については、第 3 染色体の SSR22-SSR320 の間、および第 4 染色体の SSR306-TGS0411 の間に QTL が検出された。これらの QTL はいずれも栽培種の対立遺伝子が硝酸トランスポーターの発現を高める方向に働いた。しかし、QTL × 窒素交互作用は認められなかった。なお、上述した (1) と (2) の実験において、第 3 染色体の SSR22-SSR320 の間には葉長と地上部窒素濃度の QTL が検出されており、これらの QTL は栽培種の対立遺伝子が地上部窒素濃度を低下させ、葉長を大きくする方向に働いていることが確認されている。以上の結果は、硝酸トランスポーターの発現量の違いが体内の窒素濃度に影響し、その結果として栄養成長も影響を受けていることを示唆している。硝酸トランスポーターと葉の成長に関して、Chiu ら (2004) がシロイヌナズナの硝酸トランスポーター欠損体 (*atnrt1:4-1*) では、葉柄の硝酸態窒素濃度が低下、葉身の硝酸態窒素濃度が上昇して、葉幅の広い葉が形成されると報告していることは、本実験の結果との関連で興味深い。トマトの窒素反応に対して硝酸トランスポーターがどのような働きをしているのかについては、今後さらに検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 5 件)

小林伸大

トマトの早生性に関する QTL 解析

園芸学会 2014 年 3 月 29-30 日 筑波大学

河鱈実之

低窒素条件下におけるトマト幼植物の窒素利用
効率に関するRNA-Seq 解析
園芸学会 2013年9月20-21日 岩手大学

佐々木和成

トマトの葉のサイズと角度に関わる量的形質遺
伝子座 (QTL) 解析
園芸学会 2013年3月23日-24日 東京農工大学

小林伸大

トマトの花芽分化時期に関するQTL 解析
園芸学会 2013年3月23日-24日 東京農工大学

峯洋子

トマトの葉の着生角度と葉長に関する QTL 解
析
園芸学会 2012年3月28日 大阪府立大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉山 信男 (SUGIYAMA, Nobuo)
東京農業大学・農学部・教授
研究者番号：30012040

(2)研究分担者

峯 洋子 (MINE, Yoko)
東京農業大学・農学部・准教授
研究者番号：70282704

河鱈 実之 (KAWABATA, Saneyuki)
東京大学・農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：10234113

李 温裕 (LEE, Onew)
韓国世宗大学・生命科学研究科・研究教授
研究者番号：10447360