

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660023

研究課題名(和文) トマトのイントログレッション系統を用いたホルムアルデヒド無毒化原因遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of genes for formaldehyde detoxication using tomato introgression lines

研究代表者

白武 勝裕 (Shiratake, Katsuhiro)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：90303586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：トマト栽培種と野生種のイントログレッション系統を活用し、ホルムアルデヒド無毒化能力に関わるゲノム領域の選抜を行った。そして、選抜したゲノム領域に座乗し、栽培種と野生種間で発現量が異なる遺伝子を絞り込んだところ、ペルオキシレドキシシン、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ、チトクロムP450などが候補遺伝子として見出された。一方、ホルムアルデヒド脱水素酵素(FALDH)の過剰発現シロイヌナズナを作出し、ホルムアルデヒドの耐性および吸収能が上昇することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Using introgression lines of the cultivated species and the wild species of tomato, loci related to formaldehyde detoxication had been identified. Among the genes in the candidate loci, higher or lower expressed genes in the wild species, including peroxiredoxin, UDP glucosyltransferase and cytochrome P450, were identified as candidate genes for formaldehyde detoxication. On the other hand, we confirmed that the overexpression of formaldehyde dehydrogenase in Arabidopsis increased resistance and absorbing capacity of formaldehyde.

研究分野：園芸生理・生化学

キーワード：ファイトリミディエーション シックハウス症候群 トマト ホルムアルデヒド イントログレッション系統 グルタチオン ホルムアルデヒド脱水素酵素 ギ酸脱水素酵素

1 . 研究開始当初の背景

近年 , 植物を用いた環境浄化 (ファイトリミディエーション) が注目を集め , 重金属や放射性物質などの汚染土壌の浄化にこの技術が用いられつつある (Dushenkov 2003) . 気体成分の浄化に関しては , NASA の研究者の Wolverton et al. (1989) が , 植物が室内の揮発性環境汚染物質を除去する能力を持つことを報告しているが , ホルムアルデヒドなど揮発性環境汚染物質無毒化の鍵遺伝子やメカニズムにする科学的な検証はほとんど行われていない .

申請者の一人の田淵は , 簡便かつ迅速に植物のホルムアルデヒドの無毒化能力を測定できるシステムを開発し , トマト , ゼラニウム , ノハナショウブの品種間や系統間でホルムアルデヒドの無毒化能力が著しく異なることを見出している (田淵 2009 , 未発表) . 本研究の基礎となる発見は , トマトのイントログレッション系統の片親である栽培種 *Lycopersicon esculentum* はホルムアルデヒドの無毒化能力が高くなく , もう一方の片親の野生種 *L. pennellii* は無毒化能力が非常に高いことである .

イントログレッション系統は , ある形質の原因遺伝子を探索するツールとして近年注目されており , 本研究ではトマトのイントログレッション系統を活用して , ホルムアルデヒド無毒化の鍵遺伝子を特定しようとする試みである .

2 . 研究の目的

現在の住宅の建材には , 揮発性環境汚染物質が含まれ , 住宅の高気密化にともない , 揮発性環境汚染物質による健康障害 , いわゆるシックハウス症候群の問題が顕著化している . このシックハウス症候群の主要因の物質がホルムアルデヒドである . 植物におけるホルムアルデヒドの分解メカニズムについては , 若干の研究が進められているが , その鍵遺伝子やメカニズムに関する科学的な検証はほとんどなされていない . 我々はトマトの栽培種と野生種において , ホルムアルデヒドの無毒化能力が高い系統と低い系統を見出した .

そこで本研究では , それらの “ イントログレッション系統 (ある系統の染色体に別系統の染色体断片が様々な形で置換された集団) ” を用いて , ホルムアルデヒド無毒化の鍵遺伝

子候補を選定することを目標とした . その後 , 選定した候補遺伝子がホルムアルデヒド無毒化に関わるかを , 候補遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナの作出とそのホルムアルデヒド耐性能力の検定により検証することとした .

3 . 研究の方法

(1) イントログレッション系統のホルムアルデヒド無毒化能力の検定 (玉川大学担当)

トマトでは栽培種 *L. esculentum* と野生種 *L. pennellii* のイントログレッション系統が作出されており , 74 系統が入手可能である .

我々は , *L. esculentum* のホルムアルデヒドの無毒化能力が高くなく , *L. pennellii* のそれが高いことを見出していたため , まずイントログレッション系統の中からホルムアルデヒド無毒化能力が高い系統の選抜を試みた . 選抜 (評価) は , 田淵が開発したホルムアルデヒド測定装置に , トマトの葉とホルムアルデヒドを入れ , 経時的にホルムアルデヒドの減少量をホルムアルデヒド検知管 (GASTEC No.91L および LL) により測定することにより行った .

さらに , ホルムアルデヒド高吸収種 *L. pennellii* , 中吸収 *L. esculentum* , 低吸収種 *L. chilense* について , 葉の約 3 μ m の生鮮切片を作成し , グルタチオン , ホルムアルデヒド脱水素酵素 (FALDH) , ギ酸脱水素酵素 (FDH) の消長を田淵ら (2012) の報告に準拠して , 蛍光顕微鏡および光学顕微鏡 (Olympus BX51) で検鏡・写真撮影し , それらがホルムアルデヒド分解の鍵である可能性を検討した .

(2) 遺伝子座の決定と候補遺伝子の絞り込み (名古屋大学担当)

イントログレッション系統は , バックグラウンドの染色体は *L. esculentum* であるが , 染色体の一部が *L. pennellii* に置換されている . このため , (1) の実験で選抜したホルムアルデヒド無毒化能力が高いイントログレッション系統に , *L. pennellii* の染色体のどの領域が置換されたかを調べ , トマトのゲノムブラウザで領域に存在する遺伝子を探索した .

すなわち , ホルムアルデヒド無毒化能力に関わる可能性のある *L. pennellii* の 5 つの遺伝子座 (3 番染色体の一部 , 5 番染色体の一部 , 10 番染色体の一部 2 カ所 , 11 番染色体の一部) の染色体領域を , Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>) および Tanksley et al. (1992) によって確認し , ファインマッピングに用いられたマーカーの塩基配列から *S. lycopersicum* の遺伝子情報 (ITAG2.4) を基に染色体領域に座上する遺伝子の特定を行った .

当初 , F₂ 分離集団の作出により , 候補領域の絞り込みを行うことを計画したが , 遺伝子発現データベースを活用して , 候補ゲノム領

域に座乗し、栽培種と野生種間で遺伝子の発現量が異なる遺伝子を候補として絞り込む戦略に集中した。

すなわち、NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) より Koenig et al. (2013) によって実施された *S. lycopersicum* 'M82' および *S. pennellii* LA0716 の RNAseq データをダウンロードし、成葉における候補領域内に座上する遺伝子の発現量を比較し、M82 と LA0716 と間の遺伝子の発現量の違いを確認した。

さらに、ホルムアルデヒド高吸収種 *L. pennellii*、中吸収 *L. esculentum*、低吸収種 *L. chilense* における、グルタチオン含量と FALDH および FDH とホルムアルデヒド無毒化能力の相関を遺伝子レベルで明らかにするために、半定量 RT-PCR により *L. pennellii*、*L. esculentum*、*L. chilense* における、グルタチオン合成関連遺伝子 (*GSH1*, *GSH2*, *GRI*), *FALDH*, *FDH* の遺伝子発現を明らかにした。ホルムアルデヒド分解との関連が考えられた *FALDH* については、*L. pennellii* のゲノム配列と *L. esculentum* のゲノム配列と比較することにより、変異箇所を明らかにした。

(3) 形質転換トマトの作出と評価 (名古屋大学)

上記の (2) の実験で *FALDH* の発現とホルムアルデヒド無毒化能力の間に相関が見られたため、*L. pennellii* 由来の *FALDH* cDNA を過剰発現させるベクター (カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター下で制御) を構築し、アグロバクテリウムを介した花序浸漬法によりシロイヌナズナに形質転換した。

形質転換体 T2 世代または T3 世代の種子を 0 mM, 1 mM, 3 mM のホルムアルデヒドを含む MS 培地で育成し、ホルムアルデヒドの耐性および吸収能を検定した。

(4) ゼラニウムにおけるグルタチオン含量およびホルムアルデヒド分解関連酵素活性の品種間差 (玉川大学担当)

田淵らは観賞用鉢物として人気が高いゼラニウムにおいても、ホルムアルデヒド無毒化能力が高い系統と低い系統を見出している。当初は (2) で得られた候補遺伝子についてゼラニウムにおける発現調査を行う予定であったが、実験の遅れのため、実施できなかった。そこで、ホルムアルデヒドの吸収能力の異なるゼラニウム品種の葉の約 3 μm の生鮮切片を作成し、(2) の方法と同様に、葉の切片におけるグルタチオン含量、*FALDH* 活性、*FDH* 活性を組織化学的に調査した。

4. 研究成果

(1) イントログレション系統のホルムアルデヒド無毒化能力の検定 (玉川大学担当)

トマトの栽培種 *L. esculentum* と野生種 *L. pennellii* のイントログレション系統、全 74

系統について、ホルムアルデヒド無毒化能力が高い系統 (ホルムアルデヒド無毒化能力に関わる *L. pennellii* のゲノム領域を持つ系統) の選抜を行った。その結果、3 番染色体の一部 (20 番系統)、5 番染色体の一部 (27 番系統: 5-1)、10 番染色体の一部 2 カ所 (61 番系統: 10-1-1、62 系統: 10-2 と 64 系統: 10-3 の重複領域)、11 番染色体の一部 (65 系統: 11-1 と 66 系統: 11-2 の重複領域) の 5 カ所にホルムアルデヒド無毒化能力に関わる *L. pennellii* のゲノム領域が存在する可能性が明らかになった。

一方、ホルムアルデヒド高吸収種 *L. pennellii*、中吸収 *L. esculentum*、低吸収種 *L. chilense* について、葉の切片におけるグルタチオン含量、ホルムアルデヒド脱水素酵素 (*FALDH*) 活性、ギ酸脱水素酵素 (*FDH*) 活性を組織化学的に調査した結果、いずれにおいてもホルムアルデヒド無毒化能力と含量または活性に正の相関があることを明らかになった。

(2) 遺伝子座の決定と候補遺伝子の絞り込み (名古屋大学)

当初、F₂ 分離集団の作出により、候補領域の絞り込みを行うことを計画したが、遺伝子発現データベースを活用して、候補ゲノム領域に座乗し、栽培種と野生種間で遺伝子の発現量が異なる遺伝子を候補として絞り込む戦略に集中した。

上記の (1) において玉川大学が特定したホルムアルデヒド無毒化能力に関わる可能性のある *L. pennellii* の 5 つの遺伝子座 (3 番染色体の一部、5 番染色体の一部、10 番染色体の一部 2 カ所、11 番染色体の一部) に存在する遺伝子をデータベース検索したところ、それぞれ 191 個、149 個、241 個、207 個、121 個の遺伝子が存在した。

これらの遺伝子について、*L. esculentum* と *L. pennellii* の間の遺伝子の発現量の比較を、RNAseq による *S. pennellii* と *S. lycopersicum* の遺伝子発現データを NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) からダウンロードして行った。*L. esculentum* に対して *L. pennellii* において発現量が異なる遺伝子 (fold change ≥ 2.0 および fold change ≤ 0.5) を確認したところ、3 番染色体の候補領域には、fold change ≥ 2.0 の遺伝子が 20 個、fold change ≤ 0.5 の遺伝子が 12 個存在した。5 番染色体の候補領域には、fold change ≥ 2.0 の遺伝子が 15 個、fold change ≤ 0.5 の遺伝子が 13 個存在した。10 番染色体の候補領域では、fold change ≥ 2.0 の遺伝子が 49 個、fold change ≤ 0.5 の遺伝子が 51 個存在した。11 番染色体の候補領域には、fold change ≥ 2.0 の遺伝子が 14 個、fold change ≤ 0.5 の遺伝子が 24 個存在した。

これらの遺伝子の中に、システインの細胞内分布を変化させる可能性があるシスチントランスポーターホモログ、ホルムアルデヒ

ド分解への関与が考えられるペルオキシレドキシシン,UDP-グルコシルトランスフェラーゼ,チトクロム P450 などを候補遺伝子として見出すことができた。

(3)ホルムアルデヒド分解関連遺伝子の発現解析および形質転換シロイヌナズナの出作(名古屋大学担当)

上記の(1)において玉川大学が確認したホルムアルデヒド高吸収種 *L. pennellii*, 中吸収 *L. esculentum*, 低吸収種 *L. chilense* における, グルタチオン含量と FALDH および FDH 活性とホルムアルデヒド無毒化能力の相関を遺伝子レベルで明らかにするために, 半定量 RT-PCR により *L. pennellii*, *L. esculentum*, *L. chilense* における, グルタチオン合成関連遺伝子 (*GSH1*, *GSH2*, *GR1*), *FALDH*, *FDH* の発現を明らかにした。その結果, これらの遺伝子の中で, 唯一 *FALDH* の発現がホルムアルデヒド無毒化能力と相関があることが明らかとなった。

そこで, FALDH を過剰発現させた形質転換シロイヌナズナを出し, ホルムアルデヒドの耐性および吸収能を測定したところ, FALDH 過剰発現体の実生において, ホルムアルデヒドの耐性および吸収能が上昇していることを確認した。

(4)ゼラニウムにおけるグルタチオン含量およびホルムアルデヒド分解関連酵素活性の品種間差(玉川大学担当)

当初は(2)で得られた候補遺伝子についてゼラニウムにおける発現調査を行う予定であったが, 実験の遅れのため, 実施できなかった。しかしながら, ゼラニウムにおけるグルタチオン含量およびホルムアルデヒド分解関連酵素活性の品種間差を明らかにした。

その結果, トマトと同様にホルムアルデヒド無毒化能力の高い品種において, グルタチオン含量と, FALDH および FDH の活性が高いことを確認した。この結果から, グルタチオン含量と FALDH および FDH 活性が, 植物におけるホルムアルデヒド無毒化能力の鍵であり, これらを指標にホルムアルデヒド無毒化能力の高い植物を選抜できると共に, 遺伝子組換えによるグルタチオン含量, FALDH 活性, FDH 活性の上昇によるホルムアルデヒド無毒化能力の向上の可能性が示唆された。実際, (3)の実験において, FALDH 過剰発現により, ホルムアルデヒド無毒化能力の向上を確認した。

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)

[雑誌論文](計2件)

Azuma M., Morimoto R., Hirose M., Morita Y., Hoshino A., Iida S., Oshima Y., Mitsuda

N., Ohme-Takagi M. and Shiratake K. (2016) A petal-specific *InMYB1* promoter from Japanese morning glory: a useful tool for molecular breeding of floricultural crops. *Plant Biotechnol. J.* 14: 354–363. DOI: 10.1111/pbi.12389

Reuscher S., Akiyama M., Yasuda T., Aoki K., Shibata D. and Shiratake K. (2014) The sugar transporter inventory of tomato: Genome-wide identification and expression analysis. *Plant Cell Physiol.* 55: 1123-1141. DOI: 10.1093/pcp/pcu052

[学会発表](計7件)

Reuscher S, Akiyama M, Mizuno A, Sone K, Mori C, Yasuda T, Aoki K, Shibata D and Shiratake K Genome wide analysis of aquaporin, sugar transporter and ABC transporter in tomato. The 12th Solanaceae Conference (SOL2015), Bordeaux, 25th-29th October 2015

伊串卓三, 田淵俊人, 澤田有司, 佐藤心郎, 平井優美, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕 トマトをモデルとしたホルムアルデヒド吸収・分解機構の解明 第12回日本ナス科コンソシアム年会開催, 明治大学, 2015年9月4-5日

小林孝至, 山口歩, 田淵俊人, 伊串卓三, 白武勝裕 各種野生種トマトの茎葉におけるホルムアルデヒド除去効果とその代謝関連酵素と物質の経時的消長 平成27年度園芸学会春季大会, 千葉大学, 2015年3月28-29日

伊串卓三, 田淵俊人, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕 トマトをモデルとしたホルムアルデヒド分解機構の解明 第11回日本ナス科コンソシアム年会, 名古屋大学, 2014年10月25-26日

伊串卓三, 田淵俊人, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕 トマトをモデルとしたホルムアルデヒド分解機構の解明 平成26年度園芸学会秋季大会, 佐賀大学, 2014年9月27-29日

山口歩, 田淵俊人, 小林孝至, 伊串卓三, 白武勝裕 野生種トマト, *Lycopersicon (Solanum) pennellii* の茎葉におけるホルムアルデヒド除去効果と, その代謝関連酵素と物質の経時的消長 平成26年度園芸学会秋季大会, 佐賀大学, 2014年9月27-29日

白武勝裕, 阪本浩嗣, 川崎智世, Stefan Reuscher, 秋山真仁, 水野彩夏, 鈴木真

実, 牧野治子, 森本玲奈, 太田垣駿吾 トマトのゲノムデータベースおよび EST データベースにおける ABC トランスポーターの探索と発現解析果実の成長と品質に関わるトランスポーターの探索 - トマトにおけるゲノムワイド解析およびセイヨウナシとブドウにおけるマルチオミクス - 第9回トランスポーター研究会年会, 名古屋市立大学, 2014年6月14 - 15日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白武勝裕 (Katsuhiko Shiratake)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号: 90303586

(2) 研究分担者

田淵俊人 (Toshihito Tabuchi)
玉川大学・農学部・教授
研究者番号: 70188407

(3) 連携研究者