

令和 4 年 10 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14850

研究課題名（和文）MYB3R転写因子をゲノム編集で機能破壊することで果実を大型化できる可能性の検討

研究課題名（英文）Genome-wide analysis of MYB3R transcription factors in tomato and its genome editing

研究代表者

白武 勝裕（Shiratake, Katsuhiko）

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） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：トマトで細胞分裂の制御に関わるMYB3Rのゲノムワイド解析を行ったところ、4種類（SIMYB3R1～4）のMYB3Rの存在が明らかになった。分子系統樹からの機能推定と遺伝子の発現解析の結果から、SIMYB3R1およびSIMYB3R2は細胞分裂期の果実における細胞分裂の促進に、SIMYB3R3は細胞分裂停止期の果実における細胞分裂の停止に、SIMYB3R4は果実成熟期のエンドリデュプリケーション（核内倍加）の誘導に関わる可能性が示唆された。SIMYB3R3のゲノム編集トマトを作出したところ、果実サイズは原品種と変わらなかったが、果実の長さが長くなり、時にはピーナッツ型のくびれた果実が形成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、トマトで細胞分裂の制御に関わる4種類のMYB3R（SIMYB3R1～4）の存在を明らかにし、SIMYB3R1とSIMYB3R2が果実の細胞分裂に、SIMYB3R3が果実の細胞分裂の停止に、SIMYB3R4が果実成熟期のエンドリデュプリケーション（核内倍加）の誘導に関わる可能性を示したことは、植物生理学上の学術的意義が大きい。また、SIMYB3R3のゲノム編集トマトの作出により、トマトの果実の形を変えることに成功したことは、園芸作物の育種の観点から社会的意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide analysis of MYB3R transcription factors, which regulate cell division, revealed existence 4 MYB3Rs (SIMYB3R1-4) in tomato. Phylogenetic tree and gene expression analysis of SIMYB3R1-4 in various tomato organs suggested that SIMYB3R1 and SIMYB3R2 activate cell division in fruit, SIMYB3R3 suppresses cell division in fruit, and SIMYB3R4 promotes endoreduplication in mature fruit. To change tomato fruit size, genome editing of SIMYB3R3 was performed. The knockout tomato plants of SIMYB3R3 were produced by CRISPR/Cas9 technology. The knockout tomato plants set elongated fruits and occasionally peanut-like fruits.

研究分野：園芸生理・生化学

キーワード：トマト ゲノム編集 MYB3R転写因子 果実サイズ改変 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

植物の成長に影響を与えず、作物の収穫部位を大きくすることは容易ではない。本課題の連携研究者の伊藤らは、細胞分裂の停止に働く転写因子“MYB3R”を見出し、MYB3Rの機能破壊により、シロイヌナズナの個体・器官サイズが大きくなることを示した (Kobayashi et al. 2015, EMBO J 34:1992-)。伊藤らの発見で注目すべき点は、一般的に細胞分裂の調節因子の機能を改変すると、植物の成長に悪影響が出るが、MYB3Rの機能破壊は、植物の成長に悪影響を与えずに、細胞数を増加させ、個体や器官のサイズを大きくできる点である。

近年、遺伝子組換え技術に代わる遺伝子のノックアウト・ノックダウン・ノックイン技術として、ゲノム編集が注目を集めている。代表的なゲノム技術として、ZFN (Zinc Finger Nucleases)、TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)、CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-Associated Proteins) が存在するが、中でも CRISPR/Cas9 はその手法の簡便さから、これら 3 種の方法の中で最後発ながら (Cong et al. 2013, Science 339, 819-)、最も普及している技術であり、その改変法も多数存在する。

本研究では、伊藤らがシロイヌナズナで見出した、細胞分裂を停止させる転写因子“MYB3R”と、新しいしい遺伝子のノックアウト技術である CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術に着目し、研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目標は、まず、伊藤らがシロイヌナズナにおいて見出した、細胞分裂の停止に働く転写因子“MYB3R”の、トマトにおける遺伝子ファミリーの情報を整理する (ゲノムワイド解析を行う) ことにある。すなわち、トマトのゲノムに MYB3R が何個存在するのかを明らかにし、シロイヌナズナ、タバコ、イネにおける機能解析情報を元に、細胞分裂を促進するサブファミリー、抑制するサブファミリー、その他のサブファミリーに分類する。そして、その情報と遺伝子の発現解析により、果実成長の鍵として働く、特に果実において細胞分裂の停止に働く MYB3R を特定する。

そして、特定した細胞分裂の停止に働く MYB3R をコードする遺伝子を、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集によって機能破壊することにより、植物の成長に悪影響を与えずに、利用器官を大型化できるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) トマトにおける MYB3R のゲノムワイド解析：

シロイヌナズナの MYB3R のアミノ酸配列をクエリーとして、トマトの Sol genomics network (<https://solgenomics.net>) に登録されているトマトゲノム情報 (ITAG Release 3.20)

に対して BLASTP 検索を実施した。得られた候補タンパク質のドメイン検索を、InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence-search>) および Pfam (<http://pfam.xfam.org>) において実施し、MYB ドメインを 3 つ持つタンパク質を MYB3R として同定した。

同定した MYB3R について、機能解析されているシロイヌナズナ、タバコ、イネの MYB3R と共に分子系統樹を作成し、分子系統樹から、細胞分裂を促進するサブファミリー、抑制するサブファミリー、その他のサブファミリーに分類し、機能の推定を行った。

また、トマトの MYB3R の制御下にある遺伝子を明らかにするために、STRING (<https://string-db.org/>) を用いた共発現解析を行った。

さらに、トマトの MYB3R の器官別・ステージ別の発現を明らかにするために、‘マイクロトム’の各器官由来の cDNA を鋳型とした半定量 PCR を行った。

(2) 果実において細胞分裂の停止に働くトマトの MYB3R 遺伝子のゲノム編集：

ゲノム編集には、神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科の西田敬二教授らが開発した、Target-AID システム (Nishida et al. 2016, Science 535, aaf8729-) を用いた。

上記 (1) で特定した、トマト果実において細胞分裂の停止に働くと考えられた SIMYB3R3 中のゲノム配列中で、オフターゲット効果が少ないと考えられ、エキソンとイントロンの境界付近に位置する、3 つのターゲット配列を選定した。そして選定した 3 つのターゲット配列を guide RNA として発生するゲノム編集ベクターを構築した。

作成したゲノム編集ベクターを用い、トマト‘マイクロトム’の子葉へ、アグロバクテリウム法により形質転換を行った。得られた形質転換シュートについて、ゲノム PCR による遺伝子の導入確認、プロイディーアナライザーによる倍数性の確認、ターゲット配列付近のゲノム塩基配列の解読によるゲノム編集の確認を行った。

4. 研究成果

(1) トマトにおける MYB3R のゲノムワイド解析：

シロイヌナズナの MYB3R のアミノ酸配列をクエリーとして、トマトゲノム情報を検索したところ、4 種類の MYB3R をコードする遺伝子が見出された。これら 4 種類の MYB3R について、Pfam によるドメイン検索を行った結果、いずれも MYB ドメインを 3 つ持つタンパク質であることが分かり、MYB3R として同定し、SIMYB3R1 ~ 4 と命名した。

SIMYB3R1 ~ 4 を、機能解析されているシロイヌナズナ、タバコ、イネの MYB3R と共に分子系統樹を作成したところ、細胞分裂を促進するサブファミリー (A type) に SIMYB3R1 と SIMYB3R4 が、細胞分裂を抑制するサブファミリー (C-type) に SIMYB3R3

が、その他のサブファミリー（B-type）に *SIMYB3R2* が分類された（図1）。

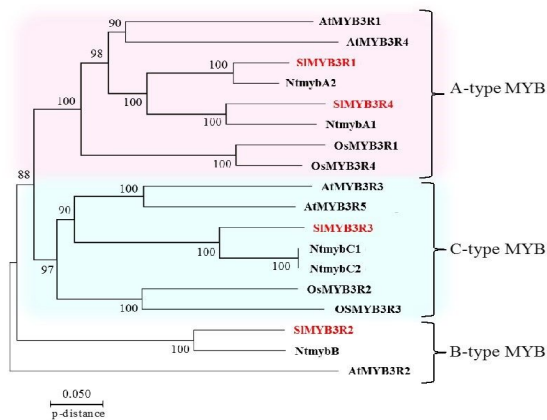
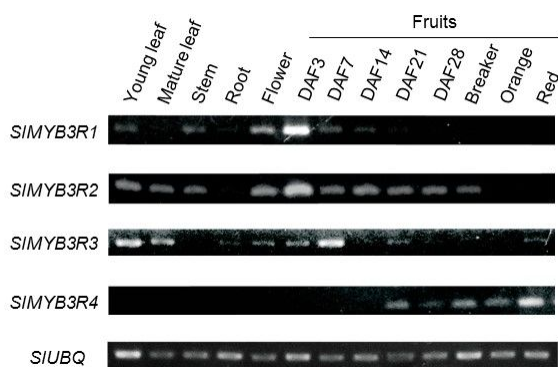


図1．トマトおよびシロイヌナズナ、タバコ、イネの MYB3R の分子系統樹

トマトの MYB3R の制御下にある遺伝子を明らかにするために、STRING (<https://string-db.org/>)を用いた共発現解析を行ったところ、*SIMYB3R1*~4 全てで 10 種類の同一の遺伝子が共発現することが分かり、その中には細胞周期関連遺伝子が多く含まれていた。このことから、*SIMYB3R1*~4 はいずれも細胞分裂の制御に関わることが推測された。

SIMYB3R1~4 のトマトの器官別・ステージ別の発現解析を行ったところ（図2）、*SIMYB3R1* は幼葉、茎、花および発育初期の果実で発現が見られ、特に開花後3日目の果実において顕著に高い発現を示した。*SIMYB3R1* は細胞分裂を促進するサブファミリー（A type）に属し、細胞分裂が活発な果実（開花後3日目）で発現していたことから、果実の細胞分裂を促進する機能を持つと考



えられた。

図2．*SIMYB3R* の器官別・果実成長ステージ別発現解析

SIMYB3R2 は根、Orange 果実、Red 果実以外の全ての器官で発現が確認され、開花後3日目の果実において最も高い発現を示した。*SIMYB3R2* の属する B-type MYB の機能は不明であるが、*SIMYB3R2* は細胞分裂期の果実において高い発現を示したことから、他の

MYB3R と協調して、トマト果実の細胞分裂を促進しているのかもしれない。

SIMYB3R3 は葉、根、花、若い果実（開花後3~21日目）と Red 果実において発現が確認され、特に幼葉と開花後7日目の果実で高い発現を示した。細胞分裂を促進するサブファミリーに属する *SIMYB3R1* の遺伝子発現は、開花後3日目の果実において顕著に高く、開花後7日目の果実において低下した。一方、細胞分裂を抑制するサブファミリー（C-type）に属する *SIMYB3R1* の遺伝子発現は、細胞分裂停止期である開花後7日目の果実において顕著に高かった。以上のことから、開花後3日目の果実においては、*SIMYB3R1* が細胞分裂を促進するが、開花後7日目になると細胞分裂を抑制する *SIMYB3R3* が発現し、果実の細胞分裂を止めているのかもしれない。

SIMYB3R4 は果実の発達後期（開花後21日目~Red）に発現しており、特に Red 果実で顕著に高い発現を示した。トマトでは果実の成熟中にエンドリデュプリケーション（核内倍加）が起こることが報告されている（Chevalier et al. 2011 *Annals Bot* 107, 1159-）。*SIMYB3R4* は細胞分裂を促進するサブファミリー（A type）に属しており、果実の成熟期に発現し、エンドリデュプリケーションの誘導に関わっているのかもしれない。

（2）果実において細胞分裂の停止に働くトマトの MYB3R 遺伝子のゲノム編集：

前述のように、（1）において、*SIMYB3R3* が、果実の細胞分裂の停止に働いている可能性が示唆された。そこで、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による *SIMYB3R3* の機能破壊を試みた。

その結果、*SIMYB3R* 遺伝子ゲノム編集トマト個体の成長は、原品種と同じであり、果実サイズも原品種とほぼ同じであったが、果実の長さが長くなり、時にはピーナッツ型のくびれた果実が形成された（図3）。



図3 *SIMYB3R* 遺伝子ゲノム編集トマトの果実。上：原品種「すずこま」。下：*SIMYB3R* 遺伝子ゲノム編集トマト。

SIMYB3R 遺伝子ゲノム編集トマトの果実の長くなった原因を調べるために、花器官および果実の組織化学的観察を行ったところ、縦方向の細胞数の増加に加え、花冠が子房を締め付ける物理的な作用によることが明らかとなった。

さらに、SIMYB3R 遺伝子ゲノム編集トマトのトランスクリプトーム解析および酵母ワンハイブリッドアッセイ (Y1H) から、SIMYB3R3 が有糸分裂特異的活性化因子モチーフに結合することにより、細胞周期関連遺伝子の抑制因子として作用することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

白武勝裕 (2018) ゲノム編集による作物育種。バイオテック東海。82号 8-13。査読無

Zheng Q., Takei-Hoshi R., Okumura H., Ito M., Kawaguchi K., Otagaki S., Matsumoto S., Luo Z., Zhang Q. and Shiratake K. (2022) Genome editing of SIMYB3R3, a cell cycle transcription factor gene of tomato, induces elongated fruit shape. *J Exp Bot* (10.1093/jxb/erac352)

Shiratake K. (2022) Genome-wide study and omis study on fruit developmental physiology. *Agri-Bioscience Monographs*. accepted. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

白武勝裕。ゲノム編集による作物育種～現状・問題点・これから～。NPO 法人東海地域生物系先端技術研究会 平成 30 年度第 1 回セミナー。2018 年 6 月 14 日
白武勝裕。園芸学研究は新しい生物学の流れをどう取り入れて発展して行くべきか。園芸学会平成 30 年度春季大会小集会「次世代の園芸研究を見据えた先端ゲノム研究(第5回)」。2018 年 3 月 23 日

山田拓志, 白武勝裕, 松本省吾, 太田垣駿吾。トマト果実成熟をエピジェネティックに制御する因子の探索と評価。第 14 回日本ナス科コンソーシアム年会。2017 年 9 月 12 - 13 日

奥村瞳, 伊藤正樹, 太田垣駿吾, 松本省吾, 白武勝裕。トマト MYB3R 遺伝子の機能解析。平成 29 年度園芸学会秋季大会。2017 年 9 月 2 - 3 日

白武勝裕。果実の高糖度化に向けた分子基盤研究とその応用。平成 29 年度常緑果樹研究会。2017 年 8 月 24 - 25 日

Katsuhiko Shiratake。Dynamic Vacuoles in Plants 2017。第 58 回日本植物生理学会年会シンポジウム。2017 年 3 月 16 - 18 日

白武勝裕。果樹・果菜・花きの品質向上を目指した分子基盤研究。農学中手の

会・第 2 回研究集会。2016 年 11 月 10 - 11 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〕

ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~hort/shira/top/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

白武 勝裕 (SHIRATAKE, Katsuhiko)
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

なし

(3)連携研究者

伊藤 正樹 (ITO, Masaki)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・
准教授
研究者番号：10242851

(4)研究協力者

なし