

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K07650

研究課題名(和文) ストリゴラクトン生合成遺伝子欠損トマトの生育特性評価とその利用

研究課題名(英文) Growth evaluation of strigolactone-biosynthetic defective mutants in tomato

研究代表者

梅原 三貴久 (Mikihisa, Umehara)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：30469895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：枝分かれの数は作物の果実の質や数に大きな影響を与える。本研究で、果実形成におけるストリゴラクトン(SL)の役割とトマトにおけるSLシグナル経路を明らかにするため、TILLING法やゲノム編集でマイクロトムのSL関連突然変異体を得て、それらの形質評価を行った。また、SLは根寄生植物の発芽を誘導するため、トマトを含む様々な農作物が根寄生植物による被害を受けている。そこで、SL生合成欠損変異体の根寄生植物の感染率を調査したところ、野生型よりも減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

典型的SLと非典型的SLの両方を産生するトマトのSLシグナル経路を明らかにすることで、下流で複数の経路が存在する意義について検証できる。また、根寄生植物はわずかなSLに反応して発芽して宿主植物に寄生する。我々のSL生合成欠損変異体では高感度なLC-MS分析で内生SLを検出できない上、根寄生植物に根滲出液を与えても発芽がほとんど確認できなかったことから、根寄生植物抵抗性トマト品種の育種に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Shoot branching is an important trait in agriculture and horticulture because it affects the number and quality of fruits. In this study, to investigate the role of strigolactones (SLs) in fruit formation and the SL pathway in tomato, we obtained some SL-related mutants of Micro-Tom by the TILLING method or genome editing and characterized phenotypes of the mutants. Furthermore, we found that infection of the root parasitic plants was lower in the roots of SL biosynthesis mutants than in WT roots because of the low germination.

研究分野：植物生理学

キーワード：ストリゴラクトン マイクロトム CCD8 MAX1 LBO D14 TILLING ゲノム編集

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の枝分かれの数は、果実の質や数に大きな影響を与える重要な要因である。枝分かれの数が多いと果実の数が増えるが、個々の果実の質は低下する。一方、枝分かれの数が少ないと個々の果実の質は上がるが、果実の数は減る。したがって、作物の果実生産の場面において、枝分かれの数が適度になるようにコントロールすることが求められる。枝分かれを制御する植物ホルモンとしてオーキシン、サイトカイニンが古くからよく知られていたが、これに加えて研究代表者はストリゴラクトン (SL) が植物の枝分かれ抑制ホルモンとしての作用があることを発見した。

SLの生合成では、 β カロテンイソメラーゼ、カロテノイド酸化開裂酵素CCD7とCCD8の3種類の酵素反応を介して β カロテンからSL生合成中間体カラクトン (CL) が共通して作られる。その後、シロイヌナズナでは*MORE AXILLARY GROWTH1 (MAX1)* がコードするシトクロムP450の酸化反応によってCLからカラクトン酸 (CLA) が作られ、メチル基が付加してカラクトン酸メチル (MeCLA) が作られる。MeCLAはSLの受容体D14に結合することができる。*LATERAL BRANCHING OXIDOREDUCTASE (LBO)* がコードする2オキシグルタル酸依存的酸化酵素によってMeCLAからヒドロキシMeCLAが作られる。また、LBOはMeCLAの脱メチル化反応も触媒する。イネでは*MORE AXILLARY GROWTH1 (MAX1)* ホモログがコードするシトクロムP450の酸化反応を経てカラクトンからSLの4デオキシオロバンコールおよびオロバンコールが作られる。トマトでは、シトクロムP450のCYP722Cが4デオキシオロバンコールを経ずにオロバンコールを合成する反応に関与する。

2. 研究の目的

本研究では、SLの果実形成に及ぼす影響を調べるために、筑波大学遺伝子実験センターが保有する矮性トマト品種マイクロトム (*Solanum lycopersicum* L.) の変異誘発系統から Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) 法でSL関連変異体を探索する、あるいはゲノム編集でSL関連のノックアウト変異体を得る。いずれかの方法で *slccd8*、*smax1*、*sllbo*、*sld14* を得て、それらの生育特性評価を行う。また、SLは植物自身に作用するだけでなく、根から放出され、ストライガ属やオロバンキ属などの根寄生植物の種子発芽を誘導する。根寄生植物は、アフリカやヨーロッパで農作物に寄生して大きな損害をもたらす、経済的な打撃を与えている。東ヨーロッパや中東地域では、トマトが *Phelipanche* 属の被害を受けており、その被害面積は5万ha以上と言われている。これらの地域では、根寄生植物への対応策が求められている。そこで、SLを作ることができない *slccd8* 欠損変異体における根寄生植物の感染率を評価する。

3. 研究の方法

マイクロトムのSL突然変異系統を用いて、果実形成におけるSLの役割とトマトにおけるSL生合成経路を明らかにし、また根寄生植物に対する影響を評価するために、以下の実験を行う。

- 1) *slccd8*、*smax1*、*sllbo*、*sld14*を入手し、枝分かれの数や果実形質などの生育特性評価を行い、野生型マイクロトムと比較する。
- 2) 1) の各変異系統の接ぎ木実験、SLの定性・定量分析、根寄生植物の発芽試験を行う。
- 3) ライゾトロン法を用いて、トマトに寄生する *Phelipanche aegyptiaca* の感染実験を行い、*slccd8* 変異体における根寄生植物の感染率を評価する。

4. 研究成果

1) SL 関連変異体の生育特性評価

TILLING法で枝分かれの数が野生型の約2倍に増加した*slccd8*を2系統獲得した¹⁾。葉の老化速度、成熟果実の割合、果実重量、果実の縦の長さ、横の長さ、種子の数、開花までの日数、果実の成熟にかかる日数、糖度、酸度などの形質評価を行った。その結果、これらの形質に関しては野生型マイクロトムと*slccd8*では、葉の老化と果実形質に大きな差は認められなかった¹⁾。*smax1*に関しても、同様にTILLING法で枝分かれの数が野生型より増加した2系統を獲得した。当初、*slccd7*、*sllbo*、*sld14*についてもTILLING法で変異体の候補を探索していたが、枝分かれの数が増加する変異体を見つけることができなかった。そこで、変異体の入手方法をゲノム編集に切り替えてノックアウト系統を作出したところ、野生型より枝分かれの数が増加する*sld14*が得られた。発芽率や形態等を評価して生育が旺盛なものを2系統選抜した。ゲノム編集で作出した*sllbo*に関しても2系統選抜した。シロイヌナズナと同様、枝分かれの数は野生型より多いが他のSL変異体に比べると少なかった。

2) SL 関連変異体の接ぎ木実験、SL の定性・定量分析、根寄生植物の発芽試験

slccd8 のシュートを野生型の根に接ぎ木すると枝分かれの数が野生型のものとほぼ同等になった。野生型のシュートに*slccd8* の根を接ぎ木しても、根からSLはほとんど検出されなかった¹⁾。この結果は、根で産生されたSLがシュートに移動することを意味する。*slccd8* と *smax1* のオロバンコールおよびソラナコールをLC-MS/MSで分析した結果、根滲出液、根いずれにおいてもほとんど検出されなかった。またこれらの変異体では、*Orobanchе minor* の種子に根滲出液を処理してもほとんど発芽が認められなかった。よって1)の枝分かれの数の結果と考え合わせると、*slccd8* と *smax1* はマイクロトムのSL生合成欠損変異体として使用できると判断されたため、目的遺伝子以外の変異を除外するために戻し交雑を行ってBC₄を得た。一方、*sld14* に関してはオロバンコールおよびソラナコールの量は野生型より蓄積しており、*Orobanchе minor* の発芽試験においても*sld14* の根滲出液では高い発芽率を示した。今後、*sld14* と他の変異体を交配して二重変異体を作成することで、中間体の分析が容易になると期待される。*sllbo* に関しては現在実験で使用する種子を確保しているところであり、今後分析に供試する予定である。*slccd8*、*smax1*、*sllbo*、*sld14* に関しては、トマトのナショナルバイオリソースプロジェクトの一環として作出したことから、現在これらの種子を筑波大学に寄託し、必要がある場合には入手可能となっている。

3) *Phelipanche aegyptiaca* の感染実験

ライゾトロン法で、トマトの根に寄生する*Phelipanche aegyptiaca*の感染実験を行い、*slccd8*における根寄生植物の感染率を評価した結果、*slccd8*の根周辺の*P. aegyptiaca*の発芽率は野生型よりも低下しており、感染率も減少傾向を示した(図1)¹⁾。よって、*slccd8*は根寄生植物抵抗性トマト品種の育種に利用できる可能性がある。

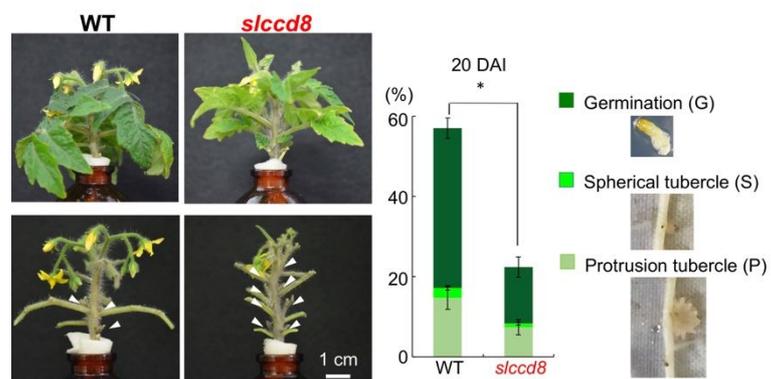


図1 *slccd8* に対する *Phelipanche aegyptiaca* の感染率

< 引用文献 >

1) Hasegawa S, Tsutsumi T, Fukushima S, Okabe Y, Saito J, Katayama M, Shindo M, Yamada Y, Shimomura K, Kaori Yoneyama, Akiyama K, Aoki K, Ariizumi T, Ezura H, Yamaguchi S, Umehara M (2018) Low infection of *Phelipanche aegyptiaca* in Micro-Tom mutants deficient in *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8*. *Int. J. Mol. Sci.* 19, E2645

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 相場北斗、長谷川翔子、梅原三貴久	4. 巻 5
2. 論文標題 ストリゴラクトン 生合成遺伝子欠損トマトの利用に向けて	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1274-1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Shindo, Shu Yamamoto, Koichiro Shimomura, Mikihiisa Umehara	4. 巻 11
2. 論文標題 Strigolactones Decrease Leaf Angle in Response to Nutrient Deficiencies in Rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00135	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 -

1. 著者名 Hasegawa Shoko, Tsutsumi Takuya, Fukushima Shunsuke, Okabe Yoshihiro, Saito Junna, Katayama Mina, Shindo Masato, Yamada Yusuke, Shimomura Koichiro, Yoneyama Kaori, Akiyama Kohki, Aoki Koh, Ariizumi Tohru, Ezura Hiroshi, Yamaguchi Shinjiro, Umehara Mikihiisa	4. 巻 19
2. 論文標題 Low Infection of <i>Phelipanche aegyptiaca</i> in Micro-Tom Mutants Deficient in CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2645
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19092645	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 -

1. 著者名 進藤真登、梅原三貴久	4. 巻 2
2. 論文標題 栄養欠乏に应答して増加するストリゴラクトンの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 914-916
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masato Shindo, Koichiro Shimomura, Shinjiro Yamaguchi, Mikihisa Umehara	4. 巻 4
2. 論文標題 Upregulation of DWARF27 is associated with increased strigolactone levels under sulfur deficiency in rice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Direct	6. 最初と最後の頁 e00050
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pld3.50	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 -

1. 著者名 梅原三貴久	4. 巻 1
2. 論文標題 ストリゴラクトンの生合成と生理作用	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1092-1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Shoko Hasegawa, Takuya Tsutsumi, Shunsuke Fukushima, Yoshihiro Okabe, Junna Saito, Mina Katayama, Masato Shindo, Yusuke Yamada, Koichiro Shimomura, Kaori Yoneyama, Kohki Akiyama, Koh Aoki, Tohru Ariizumi, Hiroshi Ezura, Shinjiro Yamaguchi, Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Micro-Tom CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8 mutants show low infection of <i>Phelipanche aegyptiaca</i>
3. 学会等名 IPGSA conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Phenotypic analysis of strigolactone-deficient mutants in rice and tomato
3. 学会等名 The 2nd International Conference on Plant and Molecular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Shindo, Koichiro Shimomura, Shinjiro Yamaguchi, Mikihisa Umehara
2. 発表標題 D27, a strigolactone biosynthetic gene, is required for adaptation in sulfate deficient condition
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shoko Hasegawa, Nao Tsunoda, Yoshihiro Okabe, Toru Ariizumi, Hiroshi Ezura, Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Characteristics of two Slccd8 mutants in Micro-Tom
3. 学会等名 Taiwan-Japan Plant Biology 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤真登、下村講一郎、山口信次郎、梅原三貴久
2. 発表標題 硫酸イオン欠乏に適応するためにD27の働きが必要である
3. 学会等名 植物化学調節学会第52回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川翔子、角田奈央、岡部佳弘、有泉亨、江面浩、梅原三貴久
2. 発表標題 トマトのストリゴラクトン欠損系統作出と特性評価
3. 学会等名 植物化学調節学会第52回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 進藤真登、下村講一郎、山口信次郎、梅原三貴久
2. 発表標題 硫酸イオン欠乏条件に应答して増加するストリゴラクトンの生理学的役割
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第35回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長谷川翔子、角田奈央、岡部佳弘、有泉亨、江面浩、梅原三貴久
2. 発表標題 マイクロトムSICCD8欠損系統2757の特性評価
3. 学会等名 日本植物細胞分子生物学会第35回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Production of tomato resistant to infection by root parasitic plants
3. 学会等名 Global Summit on Plant Science & Plant Physiology (Plant Science 2018) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梅原 三貴久
2. 発表標題 ストリゴラクトンの植物の成長調節作用
3. 学会等名 第6回植物二次代謝フロンティア研究会(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Physiological functions of strigolactones in plant growth and development
3. 学会等名 The 2nd Japan-Korea-China Trilateral Joint Symposium on Plant Biotechnology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hokuto Aiba, Koichi Sugimoto, Ryoji Shinozaki, Hiroshi Ezura, Mikihisa Umehara
2. 発表標題 Characterization of DWARF14 that encodes a strigolactone receptor in Micro-Tom
3. 学会等名 第17回日本ナス科コンソーシアム年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相場北斗、杉本貢一、篠崎良仁、江面浩、梅原三貴久
2. 発表標題 ゲノム編集によるトマトのストリゴラクトン受容体遺伝子DWARF14欠損変異体の作出
3. 学会等名 植物化学調節学会第56回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生命科学部 応用生物科学科 植物生長制御研究室 Umehara Lab.
http://www2.toyo.ac.jp/%7Eumehara/plant_biotechnology/Welcome.html

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
連携研究者	青木 考 (Aoki Koh) (30344021)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	根寄生植物の感染実験
連携研究者	岡部 佳弘 (Okabe Yoshihiro) (30752951)	筑波大学・生命環境系・助教 (12102)	マイクロトムのTILLING

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