

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07660

研究課題名（和文）単為結果性PAT-2遺伝子の分子改変による新規変異体の作出

研究課題名（英文）Development of novel mutants by genome editing of the parthenocarpic PAT-2 gene.

研究代表者

布目 司（Nunome, Tsukasa）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・ユニット長

研究者番号：50355624

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）：トマト単為結果性PAT-2遺伝子による果実形成・単為結果性発現機構の解明と採種性の改善のために、PAT-2遺伝子及びPAT-2遺伝子と協働的に働くPAT-2ホモログ遺伝子の変異体をゲノム編集により作出した。

PAT-2は花芽形成初期に発現が高く、花芽形成後期から開花・果実肥大期には発現が低かった。発現パターンが類似するPAT-2ホモログ遺伝子の変異体をゲノム編集により作出した。PAT-2変異体は単為結果性を示し、PAT-2ホモログ変異体のひとつは生育の遅延と花芽形成に異常が見られ花芽・果実形成に関与すると推測された。遺伝子間や植物ホルモンの相互作用などの更なる解析が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単為結果性は、訪花昆虫や着果剤の利用削減と着果安定が見込まれる形質であるが、単為結果性トマトは採種不安定性の改善が望まれている。トマト単為結果性PAT-2遺伝子は、ジンクフィンガー（ZF）とホメオドメイン（HD）をもつ植物に特有の転写因子（ZFHD）であることが報告されているが、その詳細な機能解析は行われていない。トマトでは23個のZFHDが推測され、そのなかでPAT-2遺伝子とPAT-2ホモログ遺伝子のひとつが花芽・果実形成に寄与することを明らかにした。これらの研究成果は、単為結果性トマトの採種性の改善、花芽・果実形成機構の解明に繋がると期待される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of fruit formation and parthenocarpic by the PAT-2 gene and to improve the seed formation of parthenocarpic tomato fruit, mutants of the PAT-2 gene and the PAT-2 homolog genes, which works in cooperate with the PAT-2 gene, were generated by genome editing.

The expression of PAT-2 was high in the early stage of flower bud formation and low in the late stage of flower bud formation, flowering and fruit growth. We selected the PAT-2 homologous genes with a similar expression pattern of PAT-2 gene and as a candidate for mutant production by genome editing. The PAT-2 mutant showed parthenocarpic, and one of the PAT-2 homologous gene mutant showed growth abnormalities in delayed and flower bud formation were observed, suggesting that they are involved in flower and fruit formation. Further analysis of the interaction between the PAT-2 and PAT-2 homologous genes, and the biosynthesis and metabolism of plant hormones is expected.

研究分野：園芸科学

キーワード：単為結果性 果実形態形成 トマト ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

トマト栽培では、果実生産の安定化を図るために、訪花昆虫による受粉促進またはホルモン剤散布による着果促進処理が行われている。単為結果性は受粉・受精しなくても果実が着果・肥大する形質であり、安定した着果が期待できる有用形質である。申請者らは、トマト品種育成に用いられているトマト単為結果性 *pat-2* の原因遺伝子を同定した。PAT-2 遺伝子による単為結果性の発現と果実形態形成機構は未解明であり、*pat-2* の多面発現による採種不安定性の改善が求められている。

PAT-2 遺伝子は 2 量体を形成して転写因子として果実形態形成の制御に関与すると推測されることから、PAT-2 遺伝子または PAT-2 遺伝子と協働的に働く PAT-2 ホモログ遺伝子の変異体は、単為結果性や採種性、果実形成に変化が現れると推測される。植物の機能解析に適用され始めたゲノム編集技術を利用して、PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子に変異を導入した変異体を作成し、単為結果性と採種性を評価するとともに花芽・果実形成への影響等を調査する。

2. 研究の目的

PAT-2 遺伝子による単為結果性の発現と果実形態形成への関与を明らかにし、*pat-2* の採種不安定性を改善するために、ゲノム編集技術を用いて PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子に変異を導入した変異体を作成し、単為結果性と採種性を評価するとともに花芽・果実形成への影響等を明らかにする。

3. 研究の方法

PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子の発現変動を調査し、PAT-2 遺伝子と協働的に働くと推定される PAT-2 ホモログ遺伝子を選定する。

PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子に変異を誘導するゲノム編集ベクターを構築し、形質転換によりトマトへ導入する。形質転換体の標的遺伝子配列を調査し、変異体を取得する。形質転換体当代の変異体のほとんどは変異をヘテロに有するため、自殖後代を獲得して変異を固定するとともに、形質転換で導入したゲノム編集遺伝子を持たない個体を選抜する。得られた標的変異をもつ変異体の単為結果性や花芽・果実形態形成を調査する。

4. 研究成果

(1) PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子の発現解析

PAT-2 遺伝子は、ジンクフィンガー (ZF) とホメオドメイン (HD) をもつ転写因子 (ZFHD) である。トマトゲノム中には 23 個の ZFHD が推定され、これら ZFHD 遺伝子の発現を調査した。

PAT-2 遺伝子は花芽形成の初期に発現が高く、花芽形成が進むにつれて発現が減少し、開花時にはほとんど発現していないことが明らかになった(図1)。このことから花芽形成初期の PAT-2 遺伝子の発現が果実形成・単為結果性に寄与していると推測されるため、花芽形成初期から開花期の遺伝子発現を調査した。

PAT-2 遺伝子は、対照植物と単為結果性を示す *pat-2* 系統で花芽形成初期の発現に違いが見られ、*pat-2* 系統では低かった。*pat-2* 系統は PAT-2 遺伝子内に約 1kb の欠失をもち欠損した転写産物を生成したためと推測される。花芽形成後期から開花にかけては発現がほとんどなく、対照植物と *pat-2* 系統では発現に違いは見られなかった。花芽及び果実形成に関与する植物ホルモン類やその生合成や代謝に関連する遺伝子との相互作用が推測されるため、さらなる詳細な解析が必要である。

PAT-2 遺伝子と同様に花芽形成初期に発現し開花に向けて発現が減少するホモログ遺伝子は 7 つだった。この中で、対照植物と *pat-2* 系統において花芽形成初期の発現に差が見られた 4 つのホモログ遺伝子をゲノム編集により変異を導入する遺伝子候補とした。他のホモログ遺伝子は PAT-2 遺伝子とは異なる発現パターン、または発現が低い遺伝子だった。

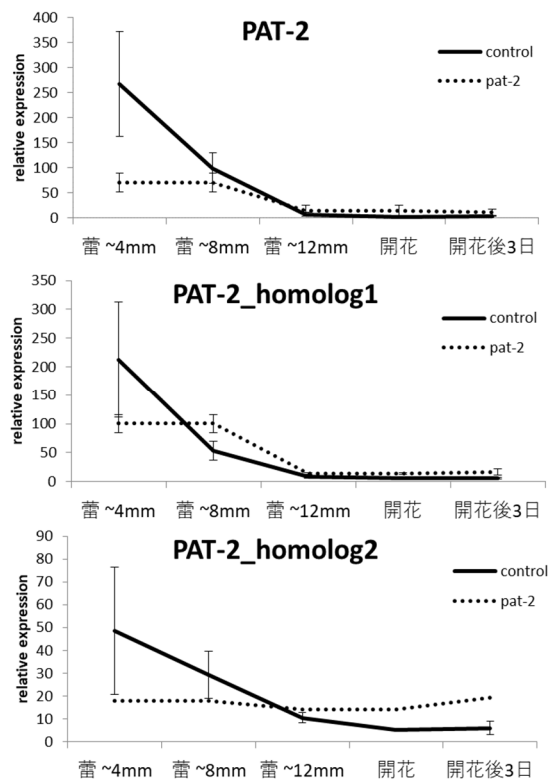


図1. PAT-2 遺伝子および PAT-2 ホモログ遺伝子の発現

(2) PAT-2 遺伝子変異体

PAT-2 遺伝子の変異体を作成するために、3か所にガイド RNA (gRNA) 配列を設計した (図 2: PAT-2)。PAT-2 遺伝子の機能を欠損及び改変するために N 末端領域とスプライシングジャンクション (SJ)、保存領域 HD に gRNA を設計し、ゲノム編集ベクターを構築した。形質転換により組換え体を取得し、標的遺伝子の変異を確認した。得られた変異体の自殖後代を採種し、変異をホモに固定し、ゲノム編集のための導入遺伝子を持たない null 分離個体を選抜した。その結果、N 末端と SJ の変異体は単為結果性を示し、PAT-2 遺伝子の機能欠損により単為結果性が発現することを確認した (図 3)。単為結果性程度と採種性の検定を進めている。また、HD 変異体は、変異のホモ固定のために形質転換当代を栽培し自殖種子の採種を行っている。

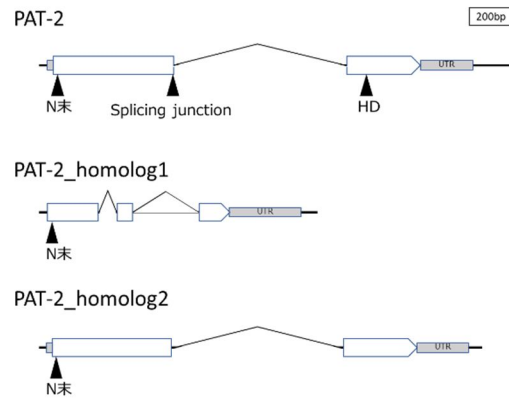


図 2. PAT-2 および PAT-2 ホモログの構造と変異導入部位 (gRNA)

(3) PAT-2 ホモログ変異体

PAT-2 ホモログ遺伝子の機能を解析するため、遺伝子の N 末端にゲノム編集のための gRNA 配列を検索した。4 つの変異導入候補遺伝子のうち 3 つの遺伝子では、特異性の高い gRNA 配列を見出してゲノム編集ベクターを構築した (図 2: PAT_homolog1, PAT2-homolog2, 3 つの遺伝子のうちの 2 つ)。しかし、1 つのホモログ遺伝子では特異性の高い gRNA 配列を見出すことができなかった。ゲノム編集ベクターを用いた形質転換により、2 つのホモログ遺伝子で変異をもつ組換え体を取得した。しかし、ひとつのホモログ遺伝子では組換え体を作成できなかった。gRNA 配列に問題があったか、変異導入により致死を誘導したと推測される。

ホモログ 1 の変異体は、生育の遅延と花芽形成の遅延と花芽の矮小化が見られた。多くの花は矮小化して開花せず、発達して開花した花の多くは柱頭が短く、稔性が低下していた。しかし、極少数の花では着果して種子を形成した。ホモログ 1 は、花・果実器官の形成に関与していることが明らかになったが、単為結果性は示さなかった。PAT-2 遺伝子との相互作用があるかなどの更なる解析が必要と考えられる。

ホモログ 2 の変異体は、正常に生育したが、単為結果性を示さなかった。この遺伝子は、単為結果性及び花芽形態形成には寄与していない可能性が高い。

今回変異体の得られなかった他のホモログ遺伝子についても変異体の作出による解析が望まれる。



図 3. 未受粉果実の着果
PAT-2 変異体は未受粉でも着果・肥大した。
開花前日に柱頭を除去した。

(4) PAT-2 新規対立遺伝子変異体の作出

PAT-2 遺伝子の発現変動により異なる表現型を示す単為結果性系統を作成するため、PAT-2 遺伝子のプロモーター領域に変異を導入した変異体の作出を試みた。PAT-2 遺伝子上流約 1kb の配列から、転写因子の結合が予測されるモチーフ配列と gRNA 配列を検索した。転写因子結合部位に PAM 配列があり、gRNA の特異性が高い配列を選定し、4 つのゲノム編集ベクターを作成した。4 つのコンストラクトで形質転換植物を作成し、自殖採種による変異のホモ化を進めている。

プロモーター配列の転写因子結合部位の予測では、多数のモチーフが見つかり、発現変動を誘導するための変異誘導候補配列の選定が難しかった。また、用いたゲノム編集手法では、得られる変異の多くは 1 塩基または数塩基の欠失だった。プロモーター配列の改変による発現変動によって遺伝子機能を改変するためには、2 つの gRNA による欠失誘導などの手法が有効と推察される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	山口 博隆 (Yamaguchi Hirotaka) (30355664)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花 き研究部門・上級研究員 (82111)	
連 携 研 究 者	刑部 敬史 (Osakabe Keishi) (70450335)	徳島大学・大学院生物資源産業学研究部(連携)・特任教授 (16101)	