

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18380016

研究課題名（和文）近縁野生種からの染色体断片導入系統を用いたトマト第8染色体の解析

研究課題名（英文）Studies of tomato chromosome 8 using chromosome segment substitution lines from wild tomato species

研究代表者

金山 喜則（KANAYAMA YOSHINORI）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10233868

研究成果の概要：トマトなどの園芸作物において、様々な有用形質を有する近縁野生種の遺伝子を通常の交雑によって導入する場合、不良形質に関わる染色体領域が混入する問題がある。このような育種上あるいは研究上の問題を解決する一つの方法として、染色体断片導入系統（Introgression Line；IL）の利用がある。本研究では、第8染色体における染色体断片導入系統の一つ、IL8-3 における糖度の増進などの第8染色体に関わる有用遺伝子座を吟味し、糖度を制御する領域を特定するとともに、環境ストレス耐性などに関わる遺伝子も IL8-3 領域に座乗していることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：園芸学・造園学

キーワード：トマト、染色体、糖度

## 1. 研究開始当初の背景

現在、代表的な果菜であるトマトでは、糖度が高い新品種の育成が期待されている。しかし、交雑親として栽培種を用いる場合、栽培種の果実の糖度が遺伝的に低いことから高糖度化には限界がある。一方、いくつかのトマトの野生種は高糖度に関わる有用遺伝子を保有しており、育種素材としての利用価

値が高い。野生種のもつ有用形質を交雑により栽培種に導入する育種法は、これまでも行われてきたが、その対象は耐病性や耐虫性などの単一の遺伝子座に支配される形質が主であった。一方、果実の糖度は複数の量的形質遺伝子座（QTL）に支配される形質である。そのため、通常の栽培種と野生種の交配では、各遺伝子座の相互作用や野生種の不良

形質の発現の影響を受けることから、単一の遺伝子座で支配される形質のような明確な表現型の分離はみられず、解析は非常に困難である。

量的形質の評価を効率的に行なうため、トマトでは栽培種 *Solanum lycopersicum* 'M82' (以下 M82) の染色体の一部を、近縁野生種 *Solanum pennellii* LA716 の染色体に置換した染色体断片置換系統 (Introgression Line: IL) が 50 系統作成されている。染色体断片置換系統は、野生種の不良形質を排除するとともに個々の QTL を単一因子として解析することが可能な、学術的にも実用的にも優れた素材である。これまでに、トマトにおいて唯一単離されている糖度に関わる QTL の一つである *Brix9-2-5* が、細胞壁インベルターゼ (*LIN5*) であることが染色体断片置換系統を利用して明らかにされていることも、この系統の有用性を示している。

## 2. 研究の目的

これまでに、染色体断片置換系統のうち、M82 の第 8 染色体の一部が *S. pennellii* の染色体で置換された IL8-3 系統の果実が、M82 に比べて高糖度であることが示唆されている。IL8-3 系統は、第 8 染色体のわずか 30cM ほどの領域 (IL8-3 領域) のみに野生種の染色体をもち、他の領域は栽培種の染色体であるため、栽培種 M82 と IL8-3 系統の比較によって、IL8-3 領域に存在する *S. pennellii* 由来の QTL を単一の遺伝子座として解析することができる。

近年、トマトに関する国際ゲノムプロジェクトの進展によりゲノム DNA の塩基配列情報などのデータベースが充実し、利用可能なデータが増えつつある。特に、日本が行なっている第 8 染色体の塩基配列の解読は他の染色体よりも早く完了していることから、第 8 染色体に関するデータが最も充実している。そのため、第 8 染色体に存在する糖度の QTL に焦点を当てた本研究を進めることは、ゲノムプロジェクトの成果を活用したポストゲノム研究として位置づけられ、学術的な意義も大きい。また、染色体断片置換系統を用いることでトマトの野生種由来の高糖度 QTL

の単離が実現した場合、交配による高糖度形質を有するトマト新品種の育成に寄与することが可能であり、産業的な貢献も期待できる。さらに、トマト以外の果菜類や果樹においてもこの高糖度遺伝子が有効な場合、DNA マーカー化による利用などの波及効果が期待できる。そこで本研究では、IL8-3 系統を用いて、野生種の高糖度化に関わる遺伝子の単離、および IL8-3 系統が高糖度形質を示す機構の解明を目的として本研究を行なった。また、野生種には生物的、非生物的ストレス耐性が備わっていることから、本研究においてもストレス耐性に関する形質の解析も行った。

## 3. 研究の方法

まず、IL8-3 領域にすでにマッピングされている DNA マーカーのうち、プライマーの配列と使用条件が公開されているものについて使用可能かどうか検討を行った。一部の DNA マーカーについては、PCR による利用を可能として使用しやすいように改変を行なった。同時に、新規 DNA マーカーの作成を試みた。材料としては M82 および IL8-3 の本葉から抽出したゲノム DNA を用い、PCR を行なった。次に、PCR 産物の塩基配列を決定し、M82 と IL8-3 の塩基配列から DNA 多型を検出した。PCR により多型を増幅するプライマーを Primer3 で再設計して STS 化し、CAPS や SCAR, SSR などのマーカーを作成した。

IL8-3 系統 F<sub>2</sub> 集団の種子を播種し、東北大学大学院農学研究科の共通温室 (無加温) および P1 温室 (25°C/19°C) で栽培した。IL8-3 領域の両端にマッピングされている DNA マーカー TG510 と CT68 を用いて、IL8-3 系統 F<sub>2</sub> 集団から IL8-3 領域において *S. pennellii* 染色体の組換えが生じている系統をスクリーニングした。さらにこれらの組換え個体について、改変あるいは作成した DNA マーカーを用いて、組換え位置の絞り込みを行った。

以上のようにして得られた組換え個体について、糖度およびその他の有用形質の検討を行った。糖度の測定には屈折糖度計を用いるとともに、糖組成を明らかにするた

めに高速液体クロマトグラフィーを用いた分析も行った。さらに、糖度の向上や生物学的あるいは非生物学的ストレス耐性についての解析を進めるための、付随する実験も行った

#### 4. 研究成果

公表されている DNA マーカーの中には使いやすさの面で問題があるものが少なくないこと、およびファインマッピングを行うにはマーカーの密度としては不十分であることから、既知の DNA マーカーの改変と新たな DNA マーカーの作出を行い、IL8-3 領域における PCR ベースのマーカーを整備した。IL8-3 領域にマッピングされている DNA マーカーのうち、CAPS マーカーである At4g22670, At1g63770, At5g41350 についてはそのまま使用した。TG510, CT148, T0487, At4g23840, CT252 については、公表されているデータをもとに PCR ベースのマーカーに改変した。また、トマトの第 8 染色体の BAC (大腸菌人工染色体) クローンの配列から、At4g12120, cLEC40M19, LEFL1032BC08 の 3 個の DNA マーカーを新たに作成した。これらうち TG510 と CT252 が SCAR, LEFL1032BC08 が SSR, その他が CAPS である。それぞれの DNA マーカーの詳細な使用条件についても明らかにした。

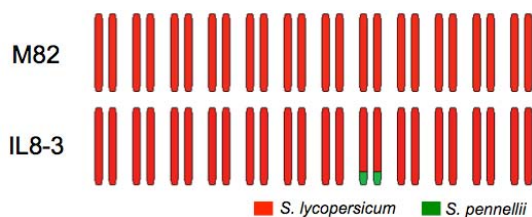


図1 染色体断片導入システムの模式図。図に示された領域において糖度などの有用形質が存在した。

次に、M82 と IL8-3 の F<sub>2</sub> を調査して、組換え体を選抜した。IL8-3 系統 F<sub>2</sub> 集団の 1000 個体以上をスクリーニングし、90 以上の組換え系統を得た。これらの各組換え体を DNA

マーカーごとに整理して 2 年にわたって糖度を調査した結果、糖度の QTL は第 8 染色体の特定領域に絞り込まれた。

IL8-3 系統の高糖度化機構を解明するために、M82 と IL8-3 の果実における糖含量の測定とヘキソーストランスポーター遺伝子の発現解析を行なった。ヘキソーストランスポーターは遺伝子ファミリーを形成していることから、3 つのヘキソーストランスポーター遺伝子それぞれについての解析を行った。果実の組織としてはコルメラ・胎座、および果皮に分けて分析した。その結果、果実内の部位および果実の発育時期特異的なヘキソース含量の系統間差が見出された。すでに明らかとなっている高糖度な果実をもつ *Solanum pennellii* とは異なる野生種では、低い液胞インベルターゼ活性が要因となってスクロースが特異的に蓄積して糖度を向上させている。しかし、本研究ではスクロース含量には系統間で差がなく、ヘキソース含量が増加していたことから、IL8-3 領域における高糖度化には新しい機構が関わっていることが明らかとなった。また、この糖含量や糖組成の結果と遺伝子発現様式を検討したところ、M82 と IL8-3 系統の糖度の違いにはヘキソーストランスポーターが関係している可能性が示唆された。この他、トマトのストレス耐性に関わる重要な知見をいくつか得ることができた。以上の成果は、ポストゲノム時代の園芸生産への先端技術の導入に資するとともに、有用な育種素材に関する情報としても有益であると考えられた。

#### 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 10 件)

- ① Y. Kawamura, A. Hase, S. Takenaka, Y. Kanayama, H. Yoshioka, S. Kamoun, H. Takahashi (2009) INF1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signaling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato. Journal of Phytopathology 157: 287-297. 査読有
- ② D. Hondo, S. Hase, Y. Kanayama, N. Yoshikawa, S. Takenaka, and H.

Takahashi (2007) The LeATL6-associated ubiquitin/proteasome system may contribute to fungal elicitor-activated defense response via the jasmonic acid-dependent signaling pathway in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 72-81. 査読有

- ③W. Ohkawa, T. Li, T. Seino, M. Nishiyama, Y. Kanayama and K. Kanahama (2007) Sugar metabolic process of the <sup>14</sup>C-photoassimilates on the translocation pathways of tomato plants. *The Tohoku Journal of Agricultural Research* 58: 13-29. 査読無
- ④R. Moriguchi, K. Kanahama, Y. Kanayama (2006) Characterization and expression analysis of the tomato telomere-binding protein LeTBP1. *Plant Science* 171: 166-174. 査読有

〔学会発表〕(計18件)

- ①西尾聡悟・藤井伸治・宮沢 豊・高橋秀幸・森口 亮・金浜耕基・金山喜則(2008) トマトにおけるオーキシン排出キャリア PIN ファミリーの解析. 園芸学会. 東京農業大学. 3月28-29日
- ②池田裕樹・平賀瑛子・西尾聡悟・金濱耕基・金山喜則(2008) 高糖度を示すトマトの第8染色体における染色体断片置換系統の解析. 園芸学会. 三重大学. 9月27-28日
- ③佐藤淳平・森口 亮・鎌田庸子・金浜耕基・金山喜則(2007) トマトにおける AINTEGUMENTAホモログLeANTと果実形成との関係. 園芸学会. 京都テルサ. 3月24-25日
- ④西尾聡悟・森口 亮・金浜耕基・白武勝裕・山木昭平・金山喜則(2007) トマトにおけるV-Ppaseの発現解析と着果における役割. 園芸学会. 京都テルサ. 3月24-25日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金山 喜則 (KANAYAMA YOSHINORI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10233868

### (2) 研究分担者

高橋 英樹 (TAKAHASHI HIDEKI)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：20197164

### (3) 連携研究者