

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 3 月 7 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05582

研究課題名（和文）トマト総乾物生産量を増大させる原因遺伝子の単離

研究課題名（英文）Isolation of a causative gene that increases total dry matter production in tomato

研究代表者

大山 暁男（Ohyama, Akio）

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

研究者番号：10355612

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：収量QTL領域が分離したNILsを用いて収量構成要素解析を行った。その結果、多収性QTLを含むNILにおいて、生鮮果実収量および総乾物生産量の有意な増大が観察された。この結果は、総乾物生産量が増大することにより生鮮果実収量の増大をもたらされることを示唆している。また、生長解析の結果により、栽培生理的な収量増大メカニズムが解明された。NILsのRNA-seq変異解析等により、原因遺伝子候補を見出し、証明実験のためのゲノム編集用ベクターの構築を行った。これらベクターを用いたトマトおよびシロイヌナズナの形質転換により、シロイヌナズナの形質転換体が得られ、現在表現型を観察している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成による同化産物（バイオマス量）の増大に関わる遺伝的要因については、極めて知見に乏しい。イネ等主要穀類では一部例があるが、双子葉植物では知る限りでは例が無い。本研究により、トマトにより初めてその遺伝子座が見出され、遺伝子座の効果が統計的に証明され、その効果が栽培生理学的に解明された点が第一の学術的意義となる。さらには、その候補遺伝子が同定された点も挙げられる。この遺伝子座の導入により、トマトの収量改善はもとより、さらには候補遺伝子が明らかになる事により、他のナス科植物並びに双子葉植物の収量を改変しうる可能性が提示できた点が第一の社会的意義となる。

研究成果の概要（英文）：NILs with segregated QTL regions were cultivated in a highly environmentally controlled greenhouse of the National Agriculture and Food Research Organization (Tsukuba). Yield component analysis of NILs indicated that both total fruit weight and total dry matter production (TDM) were significantly higher in the NIL containing the high-yield QTL. These results suggest that the total fruit weight was improved by the increase of the TDM in the NIL with the high-yield QTL. In addition, the mechanism of increase in the TDM was physiologically elucidated by growth analysis. We found the causative candidate gene by RNA-seq analysis of NILs, and constructed genome editing vectors for complementation testing of the proof of the gene. Transformation of tomato and *Arabidopsis thaliana* using these vectors was performed, and the phenotypes of transformed *Arabidopsis* are currently being observed.

研究分野：遺伝・育種

キーワード：トマト 収量 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

トマトは施設および露地における生産額が大きく、加工用途や生食用として日本のみならず世界中で広く栽培されている重要作物である。また、ナス科のモデル植物として、ジャガイモと共にいち早くゲノムシーケンスが決定された作物でもある (Tomato-Genome-Consortium, 2012)。トマトにおいては、1980年代の終わり頃から多数の重要遺伝子が単離されてきたが、その多くは病害抵抗性遺伝子を代表とする主働遺伝子であり、QTL支配である収量性 (生鮮果実収量など) の原因遺伝子については今に至るまで研究例が非常に少ない (Ohyama and Hayashi, 2016)。

その原因としては、トマトなどの果菜類は栽培が煩雑 (集約的) でかつ栄養成長と生殖成長を連続的に繰り返す無限生長を行うため形質評価が難しく、また、QTLを検出するための重要なツールである高精度DNAマーカーの開発も穀類に比べ遅れていたことがその主な理由である。

申請者は、これまでの研究過程で、多収性を示すオランダのF1トマト品種と日本の高品質F1トマト品種間の交雑後代からF2分離世代 (Ohyama et al., 2017) を経て組換え型自殖系統群 (RILs) を育成してきた。これに加え、申請者らが独自に開発してきた遺伝子座乗領域由来のゲノム網羅的なSSRマーカー (Ohyama et al., 2017)、ベイズ推定を用いたQTL検出プログラム (Hayashi, Ohyama et al., 2012) および精密な収量評価を可能にする養液栽培系の活用により、トマトの生鮮果実収量に關する主要なQTLであるtfw6.1を検出することに初めて成功した (論文準備中、図1)。

植物の収量は幾つかの構成要素に分解できるが、その中でも鍵となる「総乾物生産量」は、いかにして増大するのか? という問いに対しては現在においても明確な答えは無く、総乾物生産量を制御する原因遺伝子自体も殆ど同定されていない。穀物を中心に遺伝解析が行われているものの、園芸作物ではそれに寄与するQTLすら報告例が無く、穀物 (単子葉) と果菜類 (双子葉) における共通性・相違性に関する知見もない。その一方で、本研究で焦点を当てるtfw6.1は、RILsから派生的に作出した独自のNILs (準同質遺伝子系統。本研究の場合、tfw6.1を含むQTL領域は分離しているが、他の遺伝子座については均一で固定している系統を指す) を用いた養液栽培試験により、総乾物生産量の増大を通じて生鮮果実収量の増加 (20% \times) に寄与する遺伝子座であることを明らかにしている (未発表)。したがって、tfw6.1がトマトにおける総乾物生産量の増加を正に制御する主因子であり、その原因遺伝子を同定することが総乾物生産量の増大メカニズムの謎を解くための大きな鍵となる。また、原因遺伝子を比較解析することで、双子葉植物における総乾物生産量増大メカニズムの普遍性や、単子葉植物との共通性・相違性に関する答えも導くことができる。

2. 研究の目的

本研究では、tfw6.1領域のみが分離する申請者独自のNILsを材料として、tfw6.1の原因遺伝子を単離・同定することを目的とする。最初に、tfw6.1領域の交配による細断化と若葉を材料とした発現遺伝子の変異解析を行い、同領域が細断された系統群の総乾物生産量の評価によりtfw6.1領域を限定し、限定した領域内の変異遺伝子を検索、原因遺伝子候補

を絞り込む。次に、これら候補遺伝子群のトマトへの導入および総乾物生産量の評価により、tfw6.1の原因遺伝子を同定する。原品種と作出した形質転換体を比較解析することで、アノテーション情報から予測される形態変化・代謝メカニズムを捉えると共に、総乾物生産量を構成する要素（葉面積等）についても調査し、tfw6.1がもたらす総乾物生産量増大のメカニズムを分子および収量構成要素の面から明らかにする。

総乾物生産量が増大するという事は、個体当たりの同化産物量が増えることであり、この原因遺伝子や増収メカニズムが明らかになれば、トマトにおける収量の人為的な制御が可能になる。また本知見を基に、あらゆる園芸作物、さらには穀類について、類似の変異検索、新たな変異創出などによる増収技術の開発基盤を整えることができる。

本研究は、園芸作物では今まで解析が困難であった収量構成要素を分子レベルで紐解く新機軸であり、難解析性量的重要形質の研究に必須の材料・方法・技術等の基準を明確に示す最初の成功例となる。

3. 研究の方法

(1) NILsを用いたRNA-seq変異解析（tfw6.1領域内で変異がある発現遺伝子から候補を絞る）2種類のNILs間でtfw6.1が分離する領域をSSRマーカーを用いて限定し、その領域に対し次世代シーケンサーを用いたRNA-seq変異解析を行い、2種類のNILs間でアミノ酸配列に非同義置換を有する遺伝子群を収集する。これら遺伝子群について、アノテーション情報等のバイオインフォマティクス解析を行い、tfw6.1の候補遺伝子を絞り込む。

(2) CSSLの育成と評価（tfw6.1領域をさらに絞り込み、原因遺伝子の存在範囲を限定する）NILsを用いてさらにtfw6.1領域が細断化された染色体断片置換系統（CSSLs）を作成し、これらの乾物生産量を調査して、tfw6.1領域をさらに限定し、原因遺伝子の座乗範囲を絞り込む。

(3) NILsの形質調査（乾物量増大の原因となる構成要素を明らかにする）

NILsを養液栽培に供し、葉面積や器官毎の乾物生産量、個葉光合成能などを測定し、総乾物生産量増大の原因となる構成要素を解明する。

(4) 候補遺伝子の絞り込みと遺伝子同定のための形質転換（候補遺伝子を導入し、表現型調査のための系統育成を行う）上記1）および2）により限定したtfw6.1領域内の候補遺伝子のゲノム断片、もしくはmRNA(cDNA)より構築したキメラ遺伝子をトマト等の植物に導入し、形質転換体を作成し採種する。

(5) 形質転換体の解析による原因遺伝子の同定（表現型調査により原因遺伝子を同定する）形質転換体をP1P温室で栽培し、乾物生産量を指標とした原因遺伝子の同定を行う。併せて、形質転換体の構成要素調査を行い、tfw6.1による総乾物生産量の増大メカニズムを上記3)と併せ解明し、園芸作物ならびに植物全般の収量性メカニズムの共通性・相違性について考察する。

4. 研究成果

(1) NILsを用いたRNA-seq変異解析 (2018年度)

申請者が独自に有する、収量QTL領域が分離したトマトNILsを用いて、RNA-seq変異解析を実施した。具体的には、多収性品種「Geronimo」のQTL領域を有する系統NIL-G、日本の主力品種「桃太郎8」のQTL領域を有する系統NIL-Mを高度環境制御型温室内で養液栽培し、それぞれの脇芽を採取した。これらよりRNAを抽出し、サイズ分画したcDNAライブラリをサンプル分作成、次世代シーケンサー (HiSeq4000) 解析に供し、ペアエンドリードデータを得た (約4Gb/サンプル)。得られたリードをCLC Genomics Workbenchソフトウェア (フィルジェン社) を用いた変異解析 (Basic Variant Detectionプログラム) に供することにより、QTL領域内で非同義置換変異が生じている68個の原因遺伝子候補群を得た。

(2) CSSLの育成と評価 (2018-2019)

QTL領域が固定していない (ヘテロ接合体の) 系統019Hを自殖し、その後代848系統について、実生からDNAを抽出後、QTL領域内に座乗する複数のDNAマーカーによるスクリーニングに供した。蛍光標識されたDNAマーカーのパターンを3730 DNAシーケンサーで解析することにより、QTL領域内で組換えを起こした系統 (染色体断片置換系統、CSSL) を2つ得ることができた (それぞれAおよびBとする)。これらを自殖することにより、QTL領域が細断され、かつ固定された系統群の種子を獲得した。これら系統は現在、高度環境制御型温室において収量調査を実施した。

作出したCSSL 2系統から得られた種子をそれぞれ20~30粒播種し、発芽した実生を材料として遺伝子型がヘテロの領域に対しDNAマーカー選抜を実施した。多収性アリルで固定した系統 (A由来の系統をAG、B由来の系統をBGとする) と普通品種のアリルで固定した系統 (A由来の系統をAM、B由来の系統をBMとする) を複数個体選抜し、これらをつくばの高度環境制御型温室 (植物工場) における養液栽培に供した。その結果、AGとAMではAGが、BGとBMについては、BGが多収となったことから、AGとBGが共通する領域に目的遺伝子が存在すると考えられた。

(3) NILsの形質調査 (乾物量増大の原因となる構成要素を明らかにする)

収量QTL領域が分離したNILs 2系統 (多収性トマト品種由来のQTLアリルで固定した多収系統NIL-G、および普通品種由来のアリルで固定した対照系統NIL-M) を、農研機構 (つくば) の高度環境制御型温室において栽培し、栽培初期の生長解析並びに継時的な収量構成要素解析を行った。その結果、NIL-Gの多収性が改めて確認された (生鮮果実収量および総乾物生産量のいずれも有意に大きい)。また、生長解析、構成要素解析等により、トマト収量増大メカニズム解明のための重大な生理学的知見が得られた。

(4) 候補遺伝子の絞り込みと遺伝子同定のための形質転換 (2019-2020)

CSSL解析と、RNA-seq、NILsで解明された収量増大メカニズム、遺伝子アノテーション情報を総合し、候補遺伝子の絞り込みを行った。その結果、変異遺伝子1が、QTLの候補遺伝子と推測された。この遺伝子について、同様の変異を誘発するゲノム編集ベクターを構築し、シロイヌナズナおよびトマトへの形質転換を開始した。

(5) 形質転換体の表現型解析による原因遺伝子の同定(2020)

2020(令和2)年度については、コロナ対策のため実験時間が極端に制限されたため、ステップの多いトマトの形質転換については、進行が妨げられ、未だに形質転換体を得られていない。トマトの形質転換については、科研費の支援終了後の令和3年度以降についても、共同研究により引き続き実施する予定である。一方、シロイヌナズナを用いた形質転換については、順調に形質転換体を得られた。これら形質転換体の表現型には予想通りの変化が認められたため、今現在鉢上げし、詳細な表現型を調査するための準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kimbara Junji, Ohyama Akio, Chikano Hiroshi, Ito Hiroataka, Hosoi Katsutoshi, Negoro Satomi, Miyatake Koji, Yamaguchi Hiroataka, Nunome Tsukasa, Fukuoka Hiroyuki, Hayashi Takeshi	4. 巻 214
2. 論文標題 QTL mapping of fruit nutritional and flavor components in tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>) using genome-wide SSR markers and recombinant inbred lines (RILs) from an intra-specific cross	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-018-2295-z	査読の有無 有
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 大山 暁男、松永 啓、林 武司	4. 巻 93
2. 論文標題 高品質多収トマト育成における育種技術的展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 農業および園芸	6. 最初と最後の頁 626-631
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 Ohyama Akio, Matsunaga Hiroshi, Kawasaki Yasushi, Shirasawa Kenta, Negoro Satomi, Miyatake Koji, Yamaguchi Hiroataka, Nunome Tsukasa, Iwata Hiroyoshi, Fukuoka Hiroyuki, Hayashi Takeshi	4. 巻 219
2. 論文標題 Bayesian estimation of multi-allele QTLs for agricultural traits in tomato using recombinant inbred lines derived from two F1 hybrid cultivars	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Euphytica	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10681-022-03152-3	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河崎 靖、松永 啓、牛島弘貴、斎藤 岳士、大山 暁男、東出 忠桐
2. 発表標題 多収性トマト品種「鈴玉」を用いた至適栽培管理による多収生産の実証
3. 学会等名 園芸学会秋季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ナス科植物における可食部への同化産物分配量の調節に関する遺伝子及びその利用	発明者 大山暁男、林武司、 松尾哲、宮武宏治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-054293	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ナス科植物における総乾物生産量の制御に関する遺伝子及びその利用	発明者 大山暁男、松尾哲、 林武司、宮武宏治、 他3名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-143512	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	松尾 哲 (Matsuo Satoshi) (20414675)	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)	
研究分担者	諏訪部 圭太 (Suwabe Keita) (50451612)	三重大学・生物資源学研究科・准教授 (14101)	
研究分担者	加賀谷 安章 (Kagaya Yasuaki) (20335152)	三重大学・地域イノベーション推進機構・准教授 (14101)	
研究分担者	宮武 宏治 (Miyatake Koji) (70442754)	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・主任研究員 (82111)	

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
---------	---------