

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：21510208

研究課題名（和文） モデル作物マイクロトム系統の遺伝子破壊株整備と重要形質発現に必要な遺伝子の探索

研究課題名（英文） Collection of T-DNA insertional mutant lines of Micro-Tom and screening of essential genes for various phenotypes

研究代表者

溝口 剛 (MIZOGUCHI TSUYOSHI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70281623

研究成果の概要（和文）：矮性トマト系統（Micro-Tom）を用いて、アグロバクテリウム法により T-DNA 挿入株を作出し、T-DNA 挿入位置の確認と変異形質の解析を行った。作出した系統の中で、①花器官のかわりに葉を作る変異形質、②茎表面の突起状構造の長さが短縮された変異形質、③つぼみのサイズが縮小した変異形質、④淡緑色葉形質、⑤子葉の癒合形質等を有する系統に焦点をあてて、分子遺伝学的解析を行い、これらの形質発現に関わる遺伝子数の推定等を行った。

研究成果の概要（英文）：In this work, we generated T-DNA insertional lines of Micro-Tom with Agrobacterium. Phenotypic analyses of the tomato plants with T-DNA insertions were performed under several different photoperiodic conditions. Molecular genetic analysis was also done to estimate numbers of genes required for visible phenotypes found in the Micro-Tom mutants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：遺伝学、植物、発生、分化

1. 研究開始当初の背景

ナス科は、トマト、ナス、ピーマン、トウガラシ、タバコ、ペチュニアなどを含み、近縁植物にコーヒーがあるなど、重要な植物群である。また、双子葉植物の中ではアブラナ科（シロイヌナズナ）やマメ科（ミヤコグサ）とは進化的に離れた関係にあり、シロイヌナズナやイネに次ぐ、ゲノム解読の重要な研究

対象となっている。また、ナス科はシロイヌナズナでは研究できない多くの要素を有しており、作物への応用研究や植物の多様性研究のモデルとしても位置づけられる。このような理由から、2003年、30カ国以上の参加国により国際コンソーシアムが結成され、ナス科ゲノムプロジェクト International Solanaceae Genomics Project (SOL) が進められている。

ナス科植物の中で、トマトは世界で最も生産されている果菜類の一つで、産業的に重要な研究対象である。また、果実の発達や代謝、追熟などの研究において優れた研究材料であり、光周期応答性が中性であることなど他のモデル植物では研究しにくい多くの要素を有している。更に、ゲノムサイズが950 Mbと比較的小さく、QTL解析が進んでいるなど今までの研究蓄積が比較的多く、研究材料として有利である。

申請者らは、次世代モデル作物あるいは次世代ゲノム研究の対象として期待の大きい、「トマト」を植物科学研究の研究対象として捉え、新規な学術領域「植物の内側と外側のデザイン(形態制御、代謝・情報伝達系統御、そしてこれらとは異なる自己組織的制御など)に今一度眼を向け、その統御系・制御系から見えてくる「植物らしさ」を探る研究」の創成を目指して研究を行ってきた。この活動の中で、研究コミュニティの活性化を促す「研究基盤整備」は最重要課題の1つである。構築した研究基盤を最大限利用して、研究コミュニティ全体として、「トマト重要形質発現のメカニズム理解」を目指す環境作りが着々と進みつつあった。

他のモデル生物研究でも、遺伝子破壊株の整備が果たした役割の大きさには疑問の余地はない。先行実施してきたEMS/ガンマ線突然変異誘発系統の整備が軌道にのり、高効率の形質転換系が作出されたこの時期に、まずは中規模の遺伝子破壊株整備が必要と考えた。

2. 研究の目的

本研究提案では、植物研究基盤の中で将来的な研究リソースとなりうる「Micro-Tom T-DNA 挿入系統(遺伝子破壊株)の作出と解析」を目的とした。

3. 研究の方法

2011～2012年度の2年間で、矮性トマト系統(Micro-Tom)を用いて、アグロバクテリウム法により T-DNA 挿入株を作出し、T-DNA 挿入位置の確認と変異形質の解析を行うことを計画した。

T-DNA 挿入系統のT₁種子を1.5ml チューブ内で2～3日間吸水させ発芽を促した後、ジフィーミックス(サカタのタネ)を詰めたセルトレイに移し、25℃・16時間日長の栽培室で栽培した。T₁世代の場合、劣性の変異形質は25%の個体でしか観察できないため、1系統につき16～20個体を栽培し、変異形質をもつ個体と正常個体の系統内での割合も調べた。

培養した植物体は、培養の過程で染色体変

異を起こしている可能性があるため、フローサイトメーター(PA-II)を用いて得られた形質転換体の倍数性の調査を行った。PCR法で遺伝子導入を確認した順化個体から若い葉を1～2cm角ほど切り取りシャーレに入れ、Nuclei Extraction Buffer (Pertec) 400μlを加えてカミソリで細かく刻んだ。この液をメッシュで濾過してチューブに回収し、5分程度放置してから、Staining buffer (Pertec) 2mlを添加した。5分程度放置した後、フローサイトメーターにセットし計測を行った。まず二倍体のコントロールとしてマイクロトムの野生型を調べ、この結果を基準に形質転換体の倍数性を判定した。

4. 研究成果

遺伝子にT-DNAが挿入された場合、その遺伝子は機能を失うことが多く、遺伝子機能欠損変異体が得られる可能性が高い。遺伝子機能欠損変異の多くは劣性であるため、変異形質が表現型に初めて現れるのは変異遺伝子が遺伝子型ホモに分離するT₁世代である。したがって、T₀世代の栽培に続いてT₁世代の栽培・観察を行い、変異体を選抜した。

今回用いた形質転換法は、カルス培養を経由してT-DNA挿入系統を作出しているため、培養変異が起り得る。このため、変異形質を示すT-DNA挿入系統が得られたとしても、変異の原因がT-DNAの挿入ではなく、培養変異である可能性が考えられる。そこで、変異形質を示すT-DNA挿入系統のT₁世代集団において、系統内の個体ごとにT-DNA特異的PCRを行い、T-DNAの挿入と表現型との連鎖を調べた。

得られた変異体の中で、変異の原因遺伝子が現在までに報告されている変異体形質と類似している場合、変異候補遺伝子が挙げられるため、その遺伝子についてRT-PCRを行って発現量を調べ、野生型と比較した(図1)。

T-DNAがゲノムに挿入される際、挿入位置に数塩基の挿入や欠失などの挿入跡を残してゲノム中から抜け落ちることがある。このため、サザンブロット解析でシグナルが得られない場合や、RT-PCRでの増幅断片の長さについて電気泳動レベルで野生型と差が見られない場合でもT-DNAの挿入跡が存在し、発現量や転写産物に影響を与えることがある。そこで、RT-PCRの結果、発現量に差が見られた遺伝子について、T-DNA挿入跡の有無を調べるためにシーケンス解析を行った。

現在までに作出した系統の中に、①花器官のかわりに葉を作る変異形質、②茎表面の突起状構造の長さが短縮された変異形質、③つぼみのサイズが縮小した変異形質、④淡緑色

葉形質、⑤子葉の癒合形質等を有する系統を確認した。

①の変異形質に関しては、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の花成抑制遺伝子 *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* を矮性トマト系統 (Micro-Tom) で過剰発現することで類似の形質があらわれることがわかっている。SVP はMADS box型の転写制御因子であり、シロイヌナズナの概日時計遺伝子 *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* や *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* による花成制御や、器官伸長制御において重要な役割を果たしていることが我々の研究により明らかになっている。そこで、シロイヌナズナの *LHY* を矮性トマト系統 (Micro-Tom) で過剰発現し、花器官や葉器官形成に及ぼすその効果を検討中である。

③の変異形質については、縦の長さが4mm程のごく小さい花をつける。花序は野生型と変わらず、がくの表面のトライコームの長さにもほとんど差がないが、花の大きさが野生型に比べて5分の一程度であり、花弁が形成されない。また、葯の一つ一つが離れて独立に形成されており、雄しべが一続きの袋状になっていない。葯の表面には花粉に似た粒が観察された。子房が膨らみ、果実が発達しているが、種子が形成されているかは未確認である。

挿入された2コピーのT-DNAのうち、一方のT-DNAについては553bpのT-DNA挿入近傍配列を取得し、レトロトランスポゾン (TOTO1_LP_I | rebase:PLN|02.01.01.10.06 grande|rptmsk LTR/Gypsy|tigr TERT02) へ挿入されていることがわかった。レトロトランスポゾンへの挿入によって直接的に変異形質が現れることは考えにくい、T-DNAがその周辺遺伝子へ影響を与えている可能性もあるため、更にT-DNA挿入近傍配列の延長配列を取得し、相同性検索を行うことが望まれる。また、もう一方のT-DNA挿入近傍配列も取得し、変異形質との連鎖を調査することが必要である。

変異形質をもつ個体の出現率 (1/15) から、変異形質がT-DNAの2コピー両方の挿入に起因することも考えられるため、栽培個体を多くして表現型の分離比を再度観察し、遺伝様式を確認する必要がある。

④の変異形質については、成長点付近の若い葉の色が薄く、黄色に近い明るい黄緑色になるが、成長していくと正常な葉の色に戻った。また、花弁の色も薄い黄色になり、花弁の形が細くなる形態変化が見られた。変異形質を示す個体は、T₁個体集団25個体中7個体 (28%) だった。また、PCRでは、25個体中23

個体 (92%) でT-DNAの挿入が確認され、2遺伝子の分離による理論上の値15/16 (93.8%) とおおよそ同じ割合を示した。サザンブロット解析によっても同様のT-DNAコピー数 (2コピー) が確認された。挿入された2コピーのT-DNAのうち、一方のT-DNAの挿入近傍配列266bpを取得したが、相同性検索ではヒットする遺伝子が見つからなかった。原因遺伝子を同定するには、更にもう一方のT-DNA挿入近傍配列を取得し、変異形質との連鎖を調べる必要がある。

⑤の変異形質については、子葉が正常に展開せずに融合し、本来なら2枚の子葉の付け根の間に形成されるはずの成長点ができず、本葉が形成されないまま成長が止まった。それからは次第に子葉が肥厚し、胚軸の根元に近い部分が太くなるだけであった。種子を得ることができないため、変異遺伝子は遺伝子型ヘテロの状態で維持している。この系統において変異形質を持つ個体はT₁世代16個体中8個体 (50%) であった。遺伝様式は不完全優性であることが考えられる。この系統では、サザンブロット解析より1コピーのT-DNAの挿入が確認されている。また、T₁世代集団のPCRでは、16個体中10個体 (62.5%) でT-DNAの挿入が確認されており、この割合からもT-DNAの挿入が1コピーであることが伺える。しかし、PCRの結果、表現型とT-DNAの挿入が一致せず、変異とT-DNAは連鎖していないことがわかった。したがって、この変異は培養変異に起因するものと考えられる。更に、T-DNAの挿入による他の機構への影響も調査するため、703bpのT-DNA挿入近傍配列を取得したが、相同性検索でヒットする遺伝子はなかった。この系統の変異形質に類似した変異体は、シロイヌナズナでは *cup-fused cotyledon* などが報告されている。また、トマトではM82の変異体コレクションのデータベースで *goblet mutant* が報告されている。今後は *goblet* とのアレリズムテストも含め、候補遺伝子のシーケンス解析や発現解析、マッピングによる変異遺伝子の同定が望まれる。

トマトにおける花器官/葉器官の分化・維持のメカニズム理解に役立てたい。

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6件)

① Miyata K, Calviño M, Oda A, Sugiyama H, Mizoguchi T* (2011). Suppression of late-flowering

and semi-dwarf phenotypes in the *Arabidopsis* clock mutant *lhy-12;cca1-101* by *phyB* under continuous light. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1161-1171. 査読有り

② Kato K, Maruyama S, Hirai T, Hiwasa-Tanase K, Mizoguchi T*, Goto E, Ezura H* (2011). A trial of production of the plant-derived high-value protein in a plant factory: Photosynthetic photon fluxes affect the accumulation of recombinant miraculin in transgenic tomato fruits. *Plant Signaling & Behavior*, 6, 1172-1179. 査読有り

③ Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Brès C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H (2011). Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant Cell Physiology*, 52, 1994-2005. 査読有り

④ Nefissi R, Natsui Y, Miyata K, Oda A, Hase Y, Nakagawa M, Ghorbel A, Mizoguchi T* (2011). Double loss-of-function mutation in *EARLY FLOWERING 3* and *CRYPTOCHROME 2* genes delays flowering under continuous light but accelerates it under long-days and short-days: An important role of *Arabidopsis* CRY2 to accelerate flowering time in continuous light. *Journal of Experimental Botany* 62, 2731-2744. 査読有り

⑤ Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N, Mizoguchi T, Yamazaki Y, Aoki K, Ezura H* (2011). TOMATOMA: A novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant and Cell Physiology* 52, 283-296. 査読有り

⑥ Kato K, Yoshida R, Kikuzaki A, Hirai T, Kuroda

H, Hiwasa-Tanase K, Takane K, Ezura H, Mizoguchi T* (2010). Molecular breeding of tomato lines for mass production of miraculin in a plant factory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9505-9510. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

① Mizoguchi T, Inversion of photoperiodic response by clock mutations in *Arabidopsis*, The 11th AEARU International Workshop on Molecular Biology and Biotechnology, Dec 22-23 2011, Hong Kong.

② Mizoguchi T, Photoperiodic Flowering Controlled by Circadian Clock and Light/Dark Cycles, Symposium for Annual meeting of Korean Society of Molecular and Cellular Biology (招待講演), Oct 6-7 2011, Seoul, Korea.

③ Mizoguchi T, SVP and BZR1 Integrate Brassinosteroid Signaling and Circadian Clock to Regulate Flowering Time and Body Size in *Arabidopsis*, Interplay of Light. Photoperiodic and Circadian Clock Function in Plant Development (招待講演), May 4-6 2011, Barcelona, Spain.

④ Nefissi R, Natsui Y, Fujiwara S, Suzuki S, Hara M, Mizoguchi T, Characterization of a natural variation between Ws and Ler that may affect expression of floral repressors FLC and MAF2-5 in the clock mutant *lhy;cca1*, 2010 年度日本植物生理学会、2011 年 3 月 20-22 日、東北大学 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 剛 (MIZOGUCHI TSUYOSHI)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：70281623