

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 7日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580004

研究課題名（和文） トマト重要形質解析に向けた TILLING 技術の基盤開発

研究課題名（英文） Development of TILLING platform for the elucidation of important breeding traits in tomato

研究代表者

江面 浩 (EZURA HIROSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00332552

研究成果の概要（和文）：モデルトマト品種であるマイクロトムにおいて、EMS処理によって作成した変異体集団の中から、目的遺伝子に変異を有する変異体を選抜する TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) 技術の基盤を開発した。開発した TILLING 基盤を利用し、トマト重要育種形質の一つである果実の日持ち性に関与する成熟遺伝子に変異を有する変異体を選抜・解析し、開発した基盤の有効性を立証した。

研究成果の概要（英文）：TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) platform has been established in Micro-Tom cultivar, which is a model tomato cultivar for fruit biology. TILLING allows us to isolate mutants, which has mutations in gene of interests. Using the TILLING platform, ripening-related mutants were isolated and characterized, demonstrating the validity of the established platform.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：トマト、EMS、変異体、TILLING、重要形質、日持ち性

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナやイネのゲノム情報基盤構築が終了し、それらの情報が学術研究の推進から産業育成までの広い範囲で有用であることが示されつつあった。そして、これらの情報を活用した植物改変や品種識別などに対する国際的な期待が高まっていた。これらモデル植物での成功を受け、単なる網羅的研究ではなく、より焦点を絞り、応用研究目

的に即した作物ゲノム研究（以下、「次世代型植物ゲノム研究」と呼ぶ）の推進が国際的に叫ばれていた。このような背景から、先進国を中心とした国際コンソーシアム方式のプロジェクト研究の推進が提唱されていた。2003年にはナス科植物のモデルとしてトマトゲノム研究が、2005年7月にはウリ科植物のモデルとしてメロンゲノム研究が国際コンソーシアム方式で始まった。これらに対

して民間企業からの支援が始まっていた。これらの活動から生み出される情報は、基礎研究、応用研究、さらには産業利用の面から大きく注目されていた。

国内に目を向けると、このような多様な次世代型国際コンソーシアム方式の植物ゲノム研究に柔軟に対応できるプロジェクトはなく、現状では研究者個人の努力による貢献が大きかった。一方、我が国に対する先進諸国の研究者からの期待も極めて大きく、このような次世代型国際コンソーシアム方式の植物ゲノム研究で我が国の研究者がイニシアティブを發揮できる研究環境を構築することが緊急課題であった。しかし、当時そのような動きはなく、そのままでは、新たな植物多様性科学や適応性学の創成を目指す次世代型国際コンソーシアム方式の植物ゲノム研究で大きく後塵を拝する危惧があった。しかし、既に EMS 変異誘発集団の作成を開始していた利点を生かして、本研究を実施することにより、トマトの TILLING 技術が確立され、国際コンソーシアム研究で大きなイニシアティブを發揮できるものと考え、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、以下の4項目を目標にして実施した。

(1) トマトのゲノム研究のモデル品種の1つ、マイクロトム (Micro-Tom) を使って変異誘発系統を完成させ、さらに TILLING 技術を確立する。

(2) TILLING 技術の低コスト化、簡易化を行う。

(3) 確立した TILLING 技術を使ってトマトの育種形質に関連した重要遺伝子の変異体選抜ができることを実証する。

(4) TILLING 技術によって選抜した変異体の特性解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、マイクロトムのリソースを対象に以下の6つの項目について研究を実施した。

(1) EMS 変異誘発系統の作成：開始当時、約4000系統 (Watanabe et al., 2007) のマイクロトム変異誘発系統有したが、新たに1000系統の変異誘発系統を作成する。総計5000系統を目標とする。

(2) TILLING のための DNA プールの整備：現在、変異誘発系統2000系統からの DNA 抽出を終了しているが、残りの3000系統の M2 系統か

らゲノム DNA を抽出し、TILLING による変異体選抜のための DNA プールを構築する。

(3) TILLING の低コスト化：当時の TILLING 法では、スクリーニングを行う DNA 配列1 kb 毎に高価な特異蛍光プライマーを作成し、変異体の選抜を行っていた。そのため、他種類の DNA 配列について変異体のスクリーニングを行う場合、多数の特異蛍光プライマーを作成する必要があった。この点が TILLING 法の普及を阻む原因の一つになっていた。そこで、本研究では、ユニバーサル蛍光プライマーを使った TILLING 法を開発し、TILLING のコストの問題点を解決する。

(4) DNA プールの変異率の評価：構築した DNA プールから2000系統を利用し、機知の遺伝子配列に関する変異体を TILLING 法でスクリーニングする。得られた変異の頻度から構築した DNA プールの変異率の評価を行う。

(5) TILLING による1塩基置換変異系の選抜：構築した DNA プール全てを用いて TILLING を行い、トマトの育種形質に関連した遺伝子に1塩基置換変異が導入された変異誘発系統を同定する。

(6) 選抜した1塩基置換変異体の解析：5) で同定された変異誘発系統を解析し、その後代から1塩基置換変異を有する変異体を分離する。得られた変異体について分子遺伝学的解析を行い、変異の表現型に対する効果を解析する。

4. 研究成果

(1) EMS 変異誘発系統の作成：マイクロトムの新たな EMS 変異誘発系統を作成し、5000系統の変異誘発系統を確立した。

(2) TILLING 法のための DNA プールの整備：変異誘発系統5000系統のゲノム DNA 抽出を完了した。

(3) TILLING 法の低コスト化：特異蛍光プライマーを使って選抜した単為結果性、果実の日持ち性に関する遺伝子の変異の検出をユニバーサル蛍光プライマーにより試みたが再現性に難が認められた。逆に特異蛍光プライマーを使い精度を上げること、蛍光プライマーの販売コストが下がったことなどでコストを低減できた。これらの技術を取り入れ、マイクロトムの TILLING 技術を確立した (図1)。

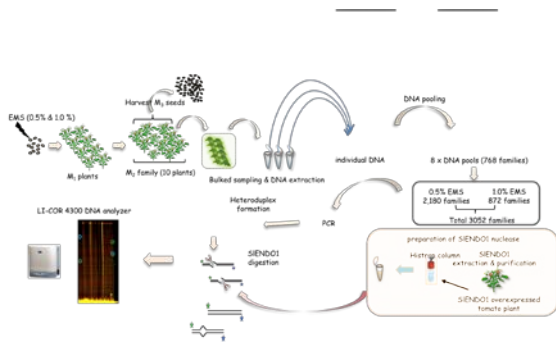


図1 TILLINGによる変異体選抜の流れ

(4) DNA プールの変異率の評価：6つのエチレン受容体遺伝子を含めた10種類の遺伝子についてTILLING技術を使い、変異体の選抜を行った。高頻度に変異誘発を行った変異体集団では、737kbに1つの頻度で変異を確認できた。実用的に十分な変異頻度と判断された。

(5) TILLINGによる1塩基置換変異系の選抜：前年度までに設計したTILLING用の蛍光プライマーを用いて、トマト変異誘発系統5000系統のTILLINGによるスクリーニングを行い、トマト重要形質(日持ち性、GABA代謝)に関連した遺伝子に変異の導入された変異誘発系統の中から日持ち性に関する変異体(エチレン受容体変異体 *Sletr1-1*, *Sletr1-2*) (図2)の解析を集中的に実施した。変異体の自殖・選抜を繰り返し、変異遺伝子がホモとなった系統を獲得した。さらに後半にこれらの変異体の表現型の解析を行い、*Sletr1-2*変異体がトマトの日持ち性改良に有望であるデータを示し、トマト育種にTILLINGプラットフォームが有効であることを実証した。

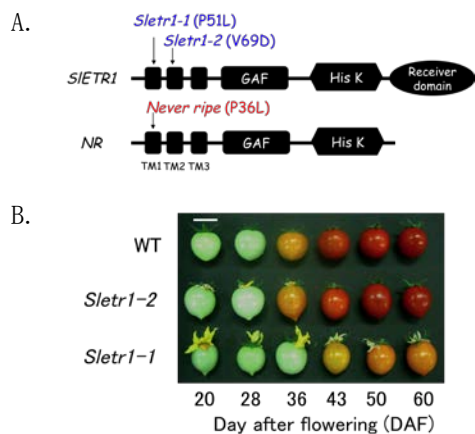


図2 エチレン受容体に確認された変異 (A) と果実の表現型に対する影響 (B) *Sletr1-1* と *Sletr1-2*:新たに発見された変異体、*Never ripe*:既知の変異体

(6) 選抜した1塩基置換変異体の解析：得られた変異体を栽培し、誘発された遺伝子変異 (*Sletr1-1*, *Sletr1-2*) の植物の表現型 (果実日持ち性) を調査し、これらの変異遺伝子が果実日持ち性向上に有効であることを明らかにした (図3)。更に、2つの変異遺伝子 (*Sletr1-1*, *Sletr1-2*) をクローニングし、アグロバクテリウム法でマイクロトムの野生型に形質転換し、組換え体がエチレン非/低感受性を示し、果実の日持ち性が大幅に向上することを示し、変異体で観察された表現型がこれらの変異遺伝子により引き起こされることを証明した (図4, 図5)。

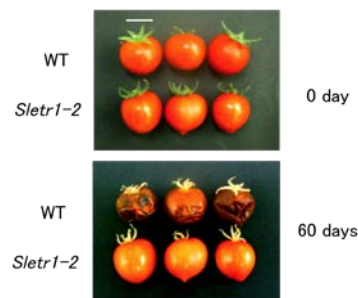


図3 *Sletr1-2*変異体の果実日持ち性。果実を収穫後に室温で60日間保存

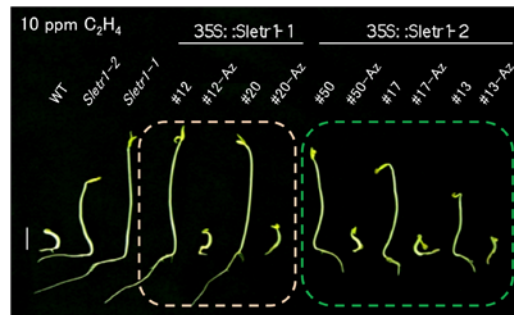


図4 変異遺伝子を導入した組換え体 (#12, #20, #50, #17, #13) 実生のエチレン感受性。 *Sletr1-1*, *Sletr1-2* は変異体, WT は非組換え体

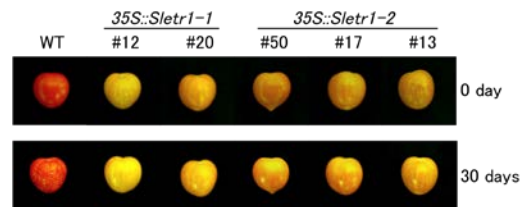


図5 変異遺伝子を導入した組換え体 (35S::*Sletr1-1*, 35S::*Sletr1-2*) 果実の日持ち性 (30日後) の比較。WT は非組換え体

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2件)

① Okabe Y, Asamizu E, Ariizumi T, Shirasawa K, Tabata S, Ezura H. Availability of Micro-Tom mutant library combined with TILLING in molecular breeding of tomato fruit shelf-life. *Breeding Science*. 査読有, 2012, 印刷中

② Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Bres C, Rothan C, Mizoguchi T, Ezura H. Tomato TILLING technology: Development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries. *Plant and Cell Physiology*. 査読有, 2011, 52(11): 1994-2005

[学会発表] (計7件)

① 岡部佳弘、浅水恵理香、有泉亨、白澤健太、田畑哲之、江面浩。トマト日持ち性分子育種へのマイクロトムTILLINGプラットフォームの利用可能性。日本育種学会第120回講演会、2012年3月29日、宇都宮大学

② Okabe Y, Asamizu E, Ariizumi T, Ezura H. Tomato ethylene receptor mutants *sletr1-1* and *sletr1-2* exhibit different levels of ethylene insensitivity and impaired fruit ripening phenotype. The IXth International Conference on the Plant Hormone Ethylene, 2012年3月20日, Rotorua Convention Centre, Rotorua, New Zealand

③ Ezura H, Okabe Y. Micro-Tom TILLING technology: A reverse genetic tool for the elucidation of important traits in tomato. 第53回日本植物生理学会年会(招待講演)、2012年3月16日、京都産業大学

④ Okabe Y, Asamizu E, Ariizumi T, Ezura H. Isolation and characterization of *Sletr1* mutant alleles exhibiting different levels of ethylene insensitivity and impaired fruit ripening phenotype. 8th Solanaceae and 2nd Cucurbitaceae Genome Conference, 2011年11月28日、神戸国際会議場

⑤ 岡部佳弘、浅水恵理香、斎藤岳士、松倉千昭、有泉亨、溝口剛、江面浩。トマト重要形質解析のためのTILLING技術の基盤開発。日本育種学会第120回講演会、2011年9月24日、福井県立大学

⑥ Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Ariizumi T, Mizoguchi T, Matsukura C, Ezura H. Development of Micro-Tom TILLING platform. 日本ナス科・ウリ科合同国際シンポジウム、2011年3月5-6日、岡山大学

⑦ Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Ariizumi T, Mizoguchi T, Matsukura C, Ezura H. Development of Micro-Tom TILLING platform. The 7th Solanaceae Conference, SOL2010, 2010年9月5-9日, Dundee, Scotland

[その他]

ホームページ等

<http://www.gene.tsukuba.ac.jp/Plant/MolecularBreeding/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江面 浩 (EZURA HIROSHI)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号: 00332552