

# 食と農の総合研究所研究プロジェクト 研究成果報告書

研究課題	トマトの新規単為結果性変異体‘No.14’の単為結果性遺伝子の同定と機能解明
研究種別	<input checked="" type="checkbox"/> 共同 <input type="checkbox"/> 個人
研究組織	滝澤 理仁（農学部・講師）研究代表者 神戸 敏成（農学部・教授）共同研究者 米森 敬三（京都大学名誉教授）共同研究者
研究期間	<input type="checkbox"/> 1年研究 <input checked="" type="checkbox"/> 2年研究
キーワード	(1) 単為結果 (2) トマト (3) 果実肥大 (4) 種子形成 (5) QTL

## 1. 2022年度の研究計画(簡潔にまとめて記入してください。)

‘No.14’は単為結果性トマト品種‘MPK-1’と非単為結果性トマト品種‘Micro-Tom’の交雑後代から出現した新規単為結果性変異体であり、本研究では、この新規変異体の原因遺伝子の同定を目的として実験を行っている。昨年度は非単為結果性品種‘マネーメーカー’と‘No.14’の交雑集団を用いた遺伝解析により、‘No.14’の単為結果性遺伝子の同定を試みたが、交雑集団から‘No.14’と同程度の単為結果性を示す交雑後代が分離せず、遺伝解析を実施できなかった。そこで本年度は‘No.14’のリシークエンス解析と親品種との塩基配列比較により、原因遺伝子の解析を試みた。

### I. ‘No.14’のリシークエンス解析

トマトの単為結果性変異体‘No.14’の若葉から Nucleon PhytoPure kit (GE社) を用いて DNA を抽出した。DNA 精製後、NEBNext® Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB社) のプロトコルに準拠してライブラリ調製を行った。作成したライブラリを Illumina NovaSeq 6000 を用いて PE150 (150bp×2 paired-end) の条件でシークエンスを行い、リードデータを取得した。

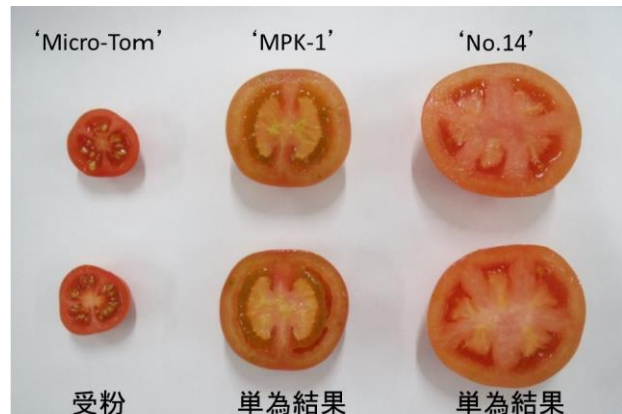
### II. ‘No.14’と親品種の変異解析

‘No.14’のリードデータとデータベースから取得した‘MPK-1’と‘Micro-Tom’のリシークエンスデータを、CLC Genomics Workbench v.22 (Filgen社) でトマトの参照配列にマッピングした。各供試品種の変異データから‘No.14’特異的な変異を選抜し、この中からアミノ酸変異を引き起こす変異を同定した。アミノ酸変異が生じた遺伝子のアノテーションを特定し、その機能から‘No.14’の原因遺伝子の候補を推定した。

## 2. 研究成果の概要(4 ページ程度)

### ‘No.14’ の単為結果性の特徴

‘No.14’の単為結果性の特徴を明らかにするため、‘No.14’と非単為結果性品種‘マネーメーカー’の除雄果実の着果率、除雄果実と受粉果実の果実重を調査し、PL 値(単為結果果実重/受粉果実重×100)を算出した。その結果、着果率と PL 値は‘マネーメーカー’で 33.3%と 6.0 だったのに対し‘No.14’では 100%と 105.0 となり、‘No.14’はマネーメーカーに比べ明らかに強い単為結果性を示した(第 1 図, 第 1 表)。これまでの研究により、‘No.14’の親品種である単為結果性トマト‘MPK-1’の PL 値は 104 であることが示されており(Takisawa ら, 2018), ‘No.14’は親品種の‘MPK-1’と同程度の強い単為結果性を示すことが明らかとなった。



第 1 図 左から‘Micro-Tom’の受粉果実, ‘MPK-1’の単為結果果実, ‘No.14’の単為結果果実

第 1 表 非単為結果性品種‘マネーメーカー’と‘No.14’における果実の着果および肥大特性

品種	除雄果実の 着果率 (%)	単為結果 果実重 (g)	受粉 果実重 (g)	PL 値
‘マネーメーカー’	33.3	4.6	76.3	6.0
‘No.14’	100.0	47.7	45.4	105.0

### ‘No.14’における単為結果性の遺伝様式の解明

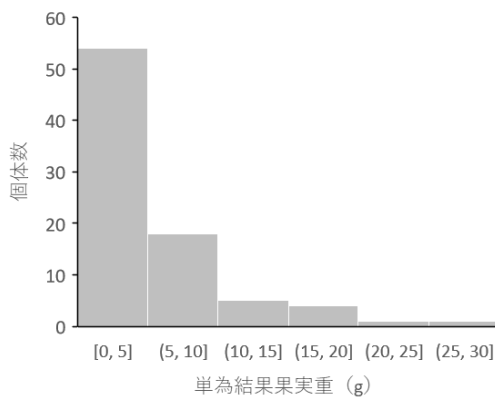
‘No.14’の単為結果性の遺伝様式を解明するため、‘マネーメーカー’と‘No.14’の交雑 F<sub>3</sub> 集団の種子, 148 粒を播種した。交雑 F<sub>3</sub> 集団の種子の発芽率は 83%と高い値を示したが、発芽個体の約 1/4 で座止が確認された(第 2 図)。χ<sup>2</sup>検定を行ったところ座止個体と通常個体の比は 1:3 に適合し、‘No.14’は座止を誘導する潜性の遺伝子を保有すると考えられた。



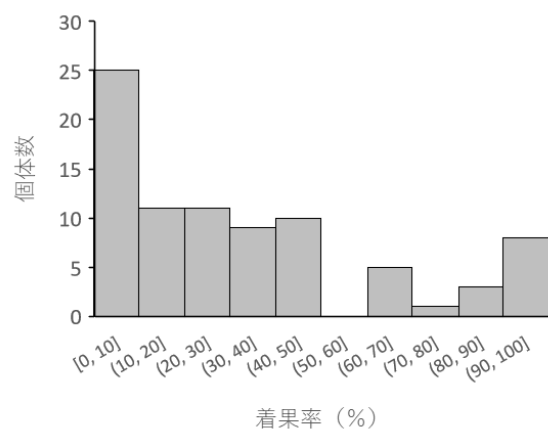
第 2 図 座止した‘マネーメーカー’と‘No.14’の交雑 F<sub>3</sub> 個体

正常に発育した 83 個体を京都大学大学院農学研究科附属農場(京都府木津川市)内の温室で栽培し、全個体で単為結果性の評価を行った。各個体の除雄果実の単為結果果実重、着果率と PL 値を調査したところ、全ての調査項目が連続分布を示し、これらの特性は複数の因子により制御されていると考えられた(第 3 図, 第 4 図, 第 5 図)。しかし、本実験では全ての項目で‘No.14’と同程度の単為結果性を示す F<sub>3</sub> 個体が認められず、この交雑 F<sub>3</sub> 集団では‘No.14’の遺伝解析は実施できないと考えられた。‘No.14’と同程度の単為結果性を示す F<sub>3</sub> 個体が分離しなかった原因として、座止に関わる遺伝子と単為結果性遺伝子が連鎖している可能性が考えられる。しかし、これが正しい場合、座止

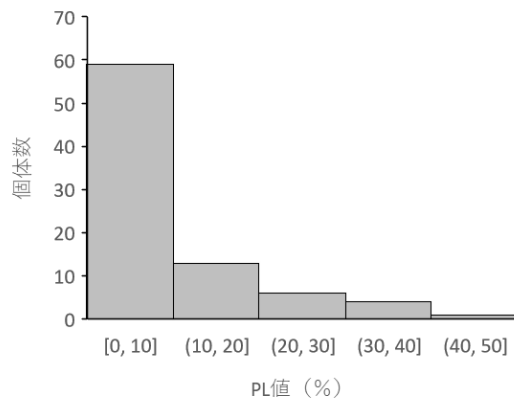
の遺伝子を同定することで単為結果性遺伝子の座乗位置を推測できるものの、座止個体では単為結果性の評価ができないため、交雑集団の解析による単為結果性遺伝子の同定は困難と考えられた。



第3図 ‘マナーメーカー’ と ‘No.14’ の交雑 F<sub>3</sub> 集団の単為結果果実重の頻度分布



第4図 ‘マナーメーカー’ と ‘No.14’ の交雑 F<sub>3</sub> 集団の着果率の頻度分布



第5図 ‘マナーメーカー’ と ‘No.14’ の交雑 F<sub>3</sub> 集団の PL 値の頻度分布

### ‘No.14’ のリシーケンス解析

‘No.14’のゲノム情報を得るため、Illumina NovaSeq 6000 を用いて PE150 (150bp×2 paired-end) の条件でシーケンスを行い、21.3Gbp のリードデータを取得した。CLC Genomics Workbench v.22 (Filgen 社) を用いて、得られたリードから Trim reads の機能でアダプター配列を取り除いた後、Sol genomics network (<https://solgenomics.net/>) からダウンロードしたトマトの参照ゲノム配列 SL4.0 およびアノテーション情報 ITAG4.0 でマッピングした。‘No.14’の親品種である単為結果性品種 ‘MPK-1’ と非単為結果性品種 ‘Micro-Tom’ のリシーケンスデータはそれぞれ DDBJ (Accession: DRA006668) と ENA (Accession: ERR34038) から入手し、入手した配列を ‘No.14’ と同様の方法でマッピングした。

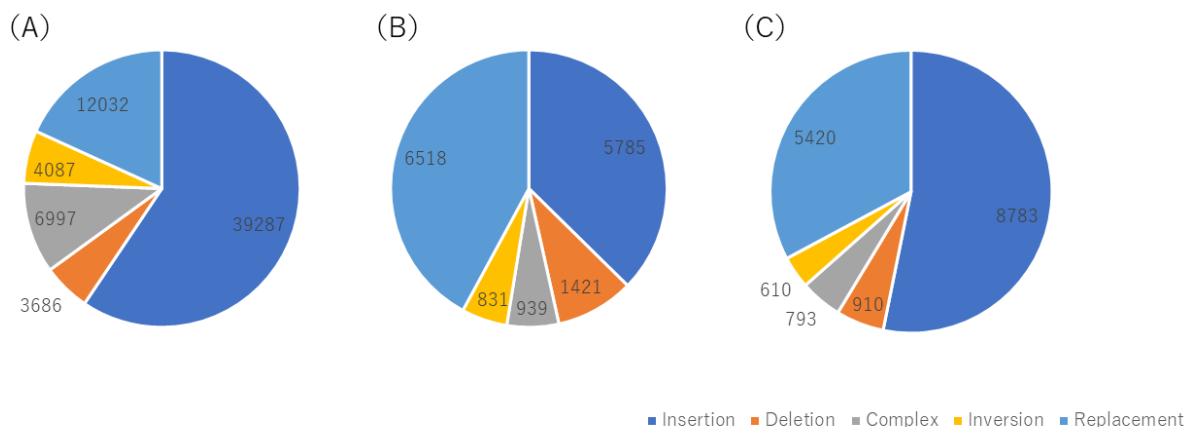
マッピングしたデータを Local Realignment の機能で他のリードのマッピング状況を考慮して部分的に修正し、Basic Variant Detection と InDels and Structural Variants の機能を用いて SNV, Insertion, Deletion および構造変異を検出した。なお、Basic Variant Detection については Coverage が 20 以上の SNV のみを選抜した。Basic Variant Detection 解析の結果、各品種特異的な Single Nucleotide Variant (SNV) はそれぞれ ‘No.14’ で 747,443, ‘MPK-1’ で 4,985,307, ‘Micro-Tom’ で 2,373,309 となり、親品種に比べ ‘No.14’ で SNV の数は少なかった (第2表)。‘No.14’ のデータサイズは親品種に比べ小さく、Coverage を 20 以上に

した結果、SNV数が少なくなったものと考えられた。一方、InsertionとDeletionについては、‘No.14’で6,483および111,386, ‘MPK-1’で8,625と14,709, ‘Micro-Tom’で6,883と13,647となった。

第2表 参照配列と‘No.14’, ‘MPK-1’および‘Micro-Tom’の間のSNV, InsertionおよびDeletion

品種・系統	SNV	Insertion	Deletion
‘No.14’	747,443	6,483	11,386
‘MPK-1’	4,985,307	8,625	14,709
‘Micro-Tom’	2,373,309	6,883	13,647

次に各品種の構造変異の調査を行った。Insertion, Deletion, Complex, Inversion, Replacementに分類し、それらの出現頻度を各品種で調査した(第6図)。それぞれの構造変異は‘No.14’でInsertion/39,287, Deletion/3,686, Complex/6,997, Inversion/4,087, Replacement/12,032, ‘MPK-1’でInsertion/5,785, Deletion/1,421, Complex/939, Inversion/831, Replacement/6,518, ‘Micro-Tom’でInsertion/8,783, Deletion/910, Complex/793, Inversion/610, Replacement/5,420となり、品種間で構造変異の割合が大きく異なっていた。また、構造変異は‘MPK-1’と‘Micro-Tom’にくらべ‘No.14’で著しく多く、‘No.14’では何らかの要因で構造変異が起こりやすくなっている可能性が示唆された。



第6図 供試品種のInsertion, Deletion, Complex, InversionおよびReplacementの数 (A) ‘No.14’, (B) ‘MPK-1’, (C) ‘Micro-Tom’

‘No.14’特異的な変異を選抜するため、Filter against Known Variantsの機能を利用して‘No.14’と‘MPK-1’, ‘Micro-Tom’の変異を比較した。その結果、‘No.14’特異的なSNVとInsertion/Deletionがそれぞれ203,930と14,577検出された。これらの変異のうち、アミノ酸の種類が変化するミスセンス変異は、SNVで917, Insertion/Deletionで115存在し、アミノ酸変異が生じている遺伝子数はSNVで316遺伝子とInsertion/Deletionで115遺伝子となった。

これまでの研究によりトマトの単為結果では植物ホルモンのオーキシン, ジベレリン, サイトカイニンおよびエチレンが大きな役割を果たしていることが知られている。そこで531遺伝子の中から、アノテーション情報を元にこれらの植物ホルモンに関連する遺伝子を選抜した。スクリーニングの結果、531遺伝子の中から、エチレンの生合成とシグナル伝達に関連する遺伝子が3遺伝子, ジベレリン生合成に関連する遺伝子が2遺伝子, オーキシンの代謝およびシグナル伝達に関連する遺伝子が2遺伝子発見された(第3表)。

第3表 ‘No.14’ でアミノ酸変異が生じている植物ホルモン関連遺伝子

遺伝子番号	アノテーション
Solyc01g005230.4	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein (AHRD V3.3 *** A0A2U1QHF5_A)
Solyc02g077820.1	Ethylene-responsive transcription factor 4 (AHRD V3.3 *** A0A1U8FGJ1_CAPAN)
Solyc03g150100.1	Ent-kaurene synthase (AHRD V3.3 *** G5CV50_SOLLC)
Solyc03g150130.1	Ent-kaurene synthase (AHRD V3.3 *** G5CV50_SOLLC)
Solyc03g150158.1	Ent-kaurene synthase (AHRD V3.3 *** G5CV50_SOLLC)
Solyc08g081535.1	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (AHRD V3.3 *** B2NIX1_CAPCH)
Solyc09g007870.3	ethylene signaling protein
Solyc10g011650.3	Auxin-responsive GH3 family protein (AHRD V3.3 *** A0A2U1MJ34_ARTAN)
Solyc11g011640.1	Auxin-responsive protein SAUR65 (AHRD V3.3 *** A0A2G3B0T7_CAPCH)

同定された遺伝子の内、*Solyc02g077820* の Ethylene-responsive transcription factor 4 については、同じファミリーの *Sletr1* の変異体で単為結果が誘導されることを Shinozaki ら (2015) が示している。また、*Solyc10g011650* の Auxin-responsive GH3 family protein は IAA にアミノ酸を結合させて不活性化体に変換する酵素であり、この遺伝子の機能欠損は子房内の IAA 濃度を高め単為結果を誘導する可能性がある。これらの報告からこの2つの遺伝子は‘No.14’の単為結果性遺伝子の候補として特に有望と考えられた。

【参考文献】

Shinozaki, Y., S. Hao, M. Kojima, H. Sakakibara, Y. Ozeki-Iida, Y. Zheng, Z. Fei, S. Zhong, J. J. Giovannoni, J. K. C. Rose, Y. Okabe, Y. Heta, H. Ezura and T. Ariizumi. 2015. Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism. *Plant J.* 83: 237–251. DOI: 10.1111/tpj.12882

Takisawa, R., T. Nakazaki, T. Nunome, H. Fukuoka, K. Kataoka, H. Saito, T. Habu and A. Kitajima. 2018. The parthenocarpic gene Pat-k is generated by a natural mutation of *SLAGL6* affecting fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *BMC Plant Biol.* 18: 72. DOI: 10.1186/s12870-018-1285-6.

### 3. 研究成果の社会的還元について

本研究プロジェクトの研究成果について（１）社会的な意義や影響（２）社会にどのように発信したのか、を平易にご説明ください。

#### （１）社会的な意義や影響

単為結果性はトマト栽培の省力化と安定化に大きく貢献する性質であり、トマトの単為結果性品種の育成は、近年、日本で問題となっている農業従事者の高齢化や地球温暖化による異常気象に対する有効な手段となりうる。

本研究により、単為結果性変異体‘No.14’はすでに市販されている単為結果性トマト品種‘MPK-1’と同程度の強い単為結果性を示すことが明らかとなり、単為結果性の強さと安定性という観点から‘No.14’は単為結果性品種育成の有望な育種親になりうると考えられた。しかし、その後の‘No.14’を片親とした交雑集団の解析により、単為結果性遺伝子が座止に関わる遺伝子と連鎖している可能性が示され、‘No.14’を母本した単為結果性品種の育種を行うには少なくとも座止にかかわる遺伝子と単為結果性遺伝子を切る必要があると考えられた。‘No.14’のリシークエンス解析と親品種との塩基配列の比較により、‘No.14’の原因遺伝子の候補を推定した。原因遺伝子を同定するにはさらなる研究が必要となるが、本研究を土台にして実験を進めることで‘No.14’の単為結果性遺伝子が同定できれば、トマトの単為結果機構の全容の解明に大きく貢献するものと考えられる。また、その単為結果性に関する基盤情報は、ナス科やウリ科の果菜類など、他の品目における単為結果性品種の開発にも有効と期待される。

#### （２）社会にどのように発信したのか

本年度は園芸学会の近畿支部学会や研究会で発表を行い、積極的に研究成果を社会に向けて発信した。今後、研究をさらに進め、論文としてまとめることで、本事業で行った研究内容をより多くの人の目に届くようにしたい。

### 4. 収支報告

（非公開）

### 5. 研究発表等（研究代表者及び研究分担者）

学会発表・発表論文・著書・学外資金獲得状況 等

○記載項目例

発表論文：著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）

学外資金獲得状況：獲得年、研究費名、代表 or 分担、研究課題名、獲得金額

<学会発表>

トマトの単為結果性変異体‘No.14’の単為結果性に関する遺伝解析。滝澤理仁。令和 4 年度園芸学会近畿支部会。2022 年 8 月 26 日。

トマトの新規単為結果性変異体‘No.14’の座止と単為結果性に関する研究。滝澤理仁。第 34 回龍谷大学 新春技術講演会。2023 年 1 月 11 日。