



トマトの生育生理を制御する植物ホルモンの調節に関する研究

松尾, 哲

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2021-03-06

(Date of Publication)

2022-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3402号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003402>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

トマトの生育生理を制御する植物ホルモンの調節
に関する研究

令和3年1月

神戸大学大学院

松尾 哲

目次

第1章 緒論	1
第2章 トマト果実形成におけるサイトカイニンの調節と役割	6
材料と方法	9
結果	14
考察	26
摘要	30
第3章 トマト果実形成におけるオーキシンの調節機構	31
材料と方法	34
結果	39
考察	49
摘要	53
第4章 トマト苗の成長における光質とジベレリン代謝機構	54
材料と方法	57
結果	60
考察	66
摘要	70
第5章 ナス科果菜類の単為結果性機構	71
材料と方法	72
結果	79
考察	88
摘要	91
第6章 総合考察	92
英文要旨	96
謝辞	99
引用文献	100

略語一覧

ABA : アブシジン酸

B 光 : 青色光

CKX : サイトカイニン酸化酵素／脱水素酵素

4-CPA : 4-クロロフェノキシ酢酸

CPPU : ホルクロルフェニユロン

2,4-D : 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸

DAO : DIOXYGENASE AUXIN OXIDATION

DZ : ジヒドロゼアチン

DZR : ジヒドロゼアチンリボシド

ESI : エレクトロスプレーイオン化

GA : ジベレリン

GA2ox : GA-2-oxidase, GA-2 位酸化酵素

GA3ox : GA-3-oxidase, GA-3 位酸化酵素

GA20ox : GA-20-oxidase, GA-20 位酸化酵素

GC : ガスクロマトグラフ

GH3 : GRETCHEN HAGEN 3

GUS : β -グルクロニダーゼ

HPLC : 高速液体クロマトグラフ

IAA : インドール酢酸

IAM : インドールアセトアミド

IAN : インドールアセトニトリル

iP : イソペンテニルアデニン

iPR : イソペンテニルアデノシン

IPT : イソペンテニル基転移酵素

IPyA : インドールピルビン酸

LOG : LONELY GUY

MRM : multiple reaction monitoring

MS : 質量分析計

m/z : 質量／電荷比

Pad-1 : PARENTAL ADVICE-1

R 光 : 赤色光

TAA1/TAR : トリプトファンアミノ基転移酵素

TRA : トリプタミン

Trp : トリプトファン

tZ : *trans*-ゼアチン

tZR : *trans*-ゼアチンリボシド

第1章 緒論

トマト (*Solanum lycopersicum* L.) はナス科に属し、日本で最も産出額が大きい野菜である (2017 年時点)。また、果実を収穫する作物のモデル植物として広く研究対象とされており、2012 年に国際コンソーシアムによってゲノム配列が解読された (The Tomato Genome Consortium, 2012)。トマトの原産地は、赤道付近のアンデス山脈の高冷地帯とされており、この地域には多くの野生種が生息している。これらは 16 世紀にヨーロッパに渡ったと考えられているが、当初は観賞用とされた。食用として用いられた時期は諸説あるが、18 世紀ごろには本格的に食用栽培されていたと考えられており、19 世紀以降に品種開発が盛んに行われ、急速に発展した。日本には江戸時代に伝来したと考えられており、当初は薬用や観賞用として扱われていた。明治維新以降に開拓使によって野菜として再度輸入されたが、明治期は食用としては振るわなかった。トマトが国内で本格的に食用とされるようになったのは戦後であり、多くの品種が開発されるようになった。現在、日本のトマト生産量は世界的に見て低くはないが、単位面積当たりの収量は、施設栽培の先進国であるオランダと比較して大きく劣る (Higashide et al, 2014)。国内で消費されているトマトの一部は、海外から輸入されており、不安定な気候による国内産地からの供給量低下や、原油、資材等の価格高騰による単価の上昇は、輸入量を増大させる。このため、単位面積当たりの収量を増加させ、収益性を向上させることが、今後の国際競争を生き抜くために必須である。

トマトの原産地であるアンデス地域は、降雨が少なく乾燥しており、赤道付近であるが気温はそれほど高くなく、日射量が大きいという特徴がある。そのため、トマトは高温や多湿を好まず、成長に多くの光を要求するという性質を持つ。日本では季節の移り変わりにより、気温や日射、湿度などが大きく変わるため、これらに適した栽培管理や品種の選択を行う必要がある。発芽後、トマトは子葉の次におおむね 8 枚程度の本葉を形成した後、第 1 花房ができ、個々の花から果実ができる。その後、およそ本葉 3 枚ごとに花房ができ、生育条件が適していればこれが継続し、大型のハウスでは、長期間に渡って果実を収穫することが可能である。現在、トマトは国内で年間を通して栽培されているが、夏期の高温や冬期の低温期には受粉や果実肥大能力が低下し、そのままでは安定して果実を形成させることはできない。また、同じ日本でも地域によって気候に大きな幅があるため、様々な作型で栽培されており、多様な時期の栽培体系に対応するため、本圃に定植するための苗が常に必要とされている。これら果実形成のコントロールや苗の継続的生産を行うには、植物の生育を人為的に制御する必要があり、収量を確保するために非常に重要である。

トマトの果実形成

トマトの果実は、雌ずいの基部である子房が発達したものであり、果実の成長は、受粉とそれに続く受精によって始まる。子房の肥大は、開花 4~5 日ごろから肉眼で観察でき、品種にもよるが、開花 30 日後くらいまで大きく進行する。その後、肥大速度は低下し、果実の着色が始まり、やがて成熟する。果実発達の初期は、3 つのフェイズに分けられる (Gillaspy et al., 1993)。フェイズIは、花器官の発達、子房の成長、開花、受粉とそれに続く受精および着果である。フェイズIIは着果後に始まる主に細胞分裂による成長であり、通常 7~10 日続く。細胞分裂の速度と期間は、遺伝子型や生育環境によって異なる。フェイズIIIは主に細胞肥大からなり、受粉 2~8 日後に始まり、果実成熟期まで続く。最終的な細胞の大きさは遺伝子型に依存し、果実全体の大きさと相関しており、果実の最終的な大きさは成熟期前にほぼ決定している。成熟期には、果実の着色と軟化が進むが、その発色の度合いで、breaker、turning、pink、red-ripe 等の段階に分けられる。

通常、果実が形成されるには、正常な受粉とそれに続く受精が必須である。受粉後、子房では様々な遺伝子の発現変化とそれに伴う代謝の変動、細胞分裂の活性化、細胞の肥大、組織の形態変化が起こり、果実が発達する。しかしながら、花粉形成から受粉・受精および果実肥大の過程は、生育環境の変化に影響を受けやすく、高温や低温、低日照などによって大きく阻害される。また、施設内の栽培では、通風不良などで花粉が柱頭にうまく到達せず、受粉が起こらない場合がある。このため、手動による振動受粉や訪花昆虫を利用した受粉が行われる。現在は受粉しなくても果実が肥大する単為結果性の形質も利用されつつあり、トマトやナスでそれを導入した品種が開発されている。しかしながら、単為結果植物には種子が得られにくいなどの欠点もあり、現時点で品種への導入は十分には進んでいない。このため、年間を通した果実の安定生産には、植物成長調節剤の処理が必要である。果菜類の種類によって効果は異なるが、オーキシンやジベレリン (GA)、サイトカイニンなどの子房への外生処理は、果実肥大を促進させる (Fos et al., 2000; Serrani et al., 2007a)。実際は、これらの植物ホルモンは植物体内でも生合成されており、果実発達を促進する重要な物質と考えられている (Abad and Monteiro, 1989; Gillaspy et al., 1993; Ramin, 2003; Srivastava and Handa, 2005)。植物成長調節剤の外生処理は、内生の植物ホルモンの代替としての働きやそれらを補強する効果があると考えられるが、その効果には処理濃度や植物の生育段階が大きく影響し、誤った処理は空洞果などの障害果発生や生育阻害につながる。このことから、内生の植物ホルモンの動態や役割を理解することは、効果的な植物成長調節剤処理方法を開発し、果実を効率的に生産するために重要である。

トマトの苗生産

トマトの栽培において、定植する苗の状態はその後の果実収量に大きく影響し、苗の

栽培は「苗半作」と言われるほど重要である。現在では、大型施設などでトマトの周年栽培が行われているため、生産現場では継続的に高品質な苗の供給が求められている。苗の生産はハウス等で行われてきたが、最近では人工照明を使用した閉鎖型植物生産システムでの商業生産も行われている。これらの施設では、光、温度、湿度等を制御でき、一年を通して苗の効率的な栽培が可能である（大山ら., 2003; Kozai, 2013）。閉鎖型植物生産システムでは、効率化のために限られたスペースで苗生産を行うため、栽培密度が高くなることが多く、密植条件では茎が伸長しやすくなり、徒長した苗は本圃での定植時に折れやすいことなどが問題となる。このため、苗生産では極端な茎の伸長を抑制することが重要である。また、用途によって求められる苗の形態は様々であり、例えば、病害抵抗性などの有用な性質を植物に導入するため、しばしば目的の品種と抵抗性を持つ植物との接ぎ木が行われるが、その作業では効率向上のために用いる台木と穂木の大きさが均一な状態であることが求められる（Singh et al., 2017）。以上のことから、トマトの苗生産においては、植物体の形態制御が重要であり、その効果的な制御法の開発が必要である。

植物ホルモン

植物ホルモンは、低濃度で植物に様々な生体反応を引き起こし、植物が共通して持つ物質の総称であり、あらゆる成長段階の調節に関わっている。オーキシン、サイトカイニン、GA、アブシジン酸（ABA）、エチレンが古くから知られており、よく研究されてきたが、現在では、これらに加えてブラシノステロイド、ジャスモン酸、サリチル酸、ストリゴラクトンなども植物ホルモン類として認識されている。それぞれの植物ホルモンは、前駆体から生合成経路の複数段階の反応を経て活性型の物質が合成される。これらは合成された部位で作用する場合や、中間体等の形で必要とされる部位に移動してから作用する場合とがある。活性型物質は、機能する部位でそれに対応する受容体タンパク質と結合し、シグナル伝達系のタンパク質などを介して多くの遺伝子の発現を制御し、様々な生体反応を引き起こす。一方、植物ホルモンは低濃度で様々な作用を起こすため、残存すると生体に害となることがあることから、不要となった活性物質の多くは速やかに不活性化される。これは、抱合体化や酸化などの反応によって行われ、不可逆的に不活性化される場合と活性型に戻ることができる形に変換される場合などがある。植物ホルモンの多くは、フィードバック作用により生合成、不活性化、移動等を通して内生量が適切になるように調節されている。これらに関係する遺伝子に変異が起こると、植物の発生の際に致死になる場合や、形成された種子が発芽しても正常に生育できない場合がある。

上記のように、植物が正常に生きていく上で必要不可欠な植物ホルモンであるが、これらの作用は様々な形で農業に利用されてきている。例えば、有名な「緑の革命」は、コムギやイネに草丈が低くなる形質（矮性形質）を導入し、施肥による植物の過度な伸

長を抑制したり、台風等による倒伏被害を軽減させることで作物に増収をもたらしたものであるが、この矮性は、GA のシグナル伝達系や生合成経路に関わる遺伝子の変異によって起こったものである (Peng et al., 1999; Ashikari et al., 2002; Spielmeier et al., 2002)。これらは遺伝子の変異を育種に利用したものであるが、花きなどの園芸作物では、ウニコナゾールやパクロブトラゾールなどの GA 生合成を阻害する薬剤処理による茎伸長抑制効果がコンパクトな形態の植物を生産するために利用されている。また、これら以外にも、合成ホルモン剤や植物ホルモンの作用を阻害する物質は、除草や着果促進のための植物成長調節剤として広く利用されている。以上のことから、植物ホルモンの役割を理解し、その制御方法を開発することは、農業における生産性の向上や安定化につながる。

植物ホルモンの定量分析

植物ホルモンの内生量の測定し、その動態を解析することは、植物ホルモンの役割を理解する上で極めて重要である。しかしながら、植物体に含まれる植物ホルモンの含量は非常に低く、その定量は困難である場合が多い。古くは生物検定法などが用いられてきたが、物質の種類の詳細な識別ができないため、生体内の動態について得られる情報は限定される。また、高速液体クロマトグラフ (HPLC) やガスクロマトグラフ (GC) などを用いた分析もその感度や個々の物質の識別等の機能面で十分ではなく、植物ホルモンの定量に向いているとは言えない。

質量分析計 (MS) は、物質を様々な方法でイオン化し、その質量/電荷比 (m/z) の違いを検出する機器であり、植物ホルモンのように同じような構造からなる一連の物質でも、その質量の違いによってそれぞれを識別することができる。また、機器の性能は日々改良が進められており、感度・分解能ともに向上し続けている。これらの MS と GC を組み合わせた GC/MS は、GC の分離能の高さと質量分析計の検出能力を併せ持つことから、古くから植物ホルモン類の分析に用いられてきた。しかしながら、GC を使用した分析では目的とする物質をガス化してカラムに導入する必要があるため、多くの植物ホルモン類は誘導体化により分析に適した形態にする必要がある。誘導体化にはジアゾメタンなどの有毒な物質を使用する必要があるとともに、その操作に熟練を要することが問題となる。一方、MS と HPLC を組み合わせた LC/MS は、GC/MS と比較すると歴史の浅い機器であるが、極性の高い化合物を誘導体化せずに HPLC 部のカラムで分離し、MS に導入することが可能であることから、植物ホルモン類の分析に広く用いられている。植物ホルモン類の分析には、タンデム四重極型質量分析計付き HPLC (LC/MS/MS) が使用されることが多い (軸丸ら, 2007)。この機器では、1 つ目の MS で目的の m/z を持つイオンを選択し、それらのイオンを開裂させ、生じたフラグメントイオンを 2 つ目の MS で検出する。これにより、高選択性、高感度の分析が可能となる。

植物ホルモンの多くは内生量が低く、様々な物質が含まれている生体内での濃度を測定するには、検出の妨げとなる成分を除去するための操作を必要とする場合がほとんどである。精製は、その物性の違いを利用した分画によって行われることが多い。古くから有機溶媒を用いた液液分配による精製が行われてきたが、作業量が多く煩雑であり、有害な有機溶媒の使用量が多いなどの理由から、現在は操作が簡便で有機溶媒の使用量が少ない固相抽出による精製が主流になってきている。利用できる固相カラムには様々な種類があり、極性の違いによる分離の他に、酸性、塩基性、中性の物質を分離することできるものなどがある。植物ホルモンのうち、GA、インドール酢酸 (IAA)、ABA など多くのものは酸性物質であるが、サイトカイニン類は塩基性物質であり、これら以外にも中間体などの関連物質は異なる性質を持つ。これらの物性の違いを利用し、固相カラムへの物質の吸着、カラム洗浄による夾雑物の除去、目的物質のカラムからの脱離を行うことにより精製が行われる。しかしながら、精製過程では分析の妨げとなる多くの物質を除去することができるが、測定対象の植物ホルモン自体の一部も失われてしまうことがある。そのため、これらの正確な定量を行うには、精製過程で失われる割合を反映させる指標となる物質（内部標準）をサンプルに添加して精製を行い、最終的に検出される内部標準と内生物質の比率で測定値を補正することが多い。用いる内部標準は、出来るだけ分析対象の物質に近い物性を持ち、かつ目的物質の検出を阻害しないものである必要がある。そこで、目的とする物質の水素や炭素を重水素 (^2H) や ^{13}C などの安定同位体で置換したものが内部標準として使用されることが多い。これらは、内生物質とほぼ同じ物性を持つが分子量が異なるため、MS で内生のものと識別することができる。現在、安定同位体によりラベルされた様々な植物ホルモン類が試薬として入手可能である。以上のように、現在では、高感度の LC/MS/MS、様々な種類の固相抽出カラムおよび内部標準物質が利用出来るようになってきていることから、植物ホルモン関連物質の一斉分析をハイスループットに実施することも可能であり、植物のゲノム情報の利用や関連遺伝子変異体の解析と組み合わせて植物ホルモンに関する分子生物学的研究が活発に行われている。

本研究の目的

本研究は、近年急速に進展したトマトのゲノム情報から得られた植物ホルモン関連遺伝子群の解析を行うとともに、LC/MS/MS を使用した植物ホルモン関連物質の精密定量分析や外生的なホルモン処理実験、ナス単為結果変異体の解析を行い、トマト等の果実発達や形態形成に影響する植物ホルモン類の制御機構を明らかにし、生育制御につなげるための基礎的知見を得ることを目的として実施した。

第2章 トマト果実形成におけるサイトカイニンの

調節と役割

サイトカイニン類は細胞分裂を促進する働きを持つ植物ホルモンであり、頂芽優勢、維管束系の発達、老化抑制等に関与している (Werner et al., 2003; Sakakibara, 2006; Argueso et al., 2009)。果実形成とサイトカイニンの関係については、外生処理による効果が古くから調べられており、合成サイトカイニンのベンジルアミノプリンやホルクロルフェニユロン (CPPU) を果菜や果樹の花などに処理すると、果実が肥大することが確認されている (Hayata et al., 1995, 2000; Ohara et al., 1997; Flaishman et al., 2001; Stern et al., 2003; Zabadal and Bukovac, 2006)。この現象は、ブドウ、キウイフルーツ、メロン、スイカ、リンゴおよび洋ナシなどで確認されており、植物成長調節剤としてウリ科等の着果促進やブドウの着粒の安定、果粒肥大促進に使用されている。

外生処理の効果の知見と比較して、果実発達期の内生サイトカイニンの動態は、ほとんど明らかにされてこなかった。Bohner と Bangerth (1988) は、ラジオイムノアッセイを用いた定量によって、開花 5 日後のトマトで内生サイトカイニンが上昇することを確認している。また、いくつかのバイオアッセイを用いた研究では、サイトカイニン活性が、トマト等の細胞分裂活性の増加にともない上昇することが報告されている (Abdel-Rahman, 1975; Mapelli, 1981)。これらの結果から、内生のサイトカイニンは、果実形成、特に細胞分裂期に重要な役割を持つと考えられている。しかしながら、これらの試験方法では、物質の定性的な解析は難しく、サイトカイニン関連物質の詳細な情報は得られないため、その役割を理解するには、分子種ごとの動態を把握する必要がある。

植物において、内生のサイトカイニン含量は生合成と不活性化によって調節されている (Hirose et al., 2008)。多くの植物のサイトカイニン生合成の最初のステップは、イソペンテニル転移酵素 (IPT) によって触媒され、アデノシンリン酸からイソペンテニルアデニン (iP) 型のヌクレオチドが合成される (図 1、Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001)。iP 型ヌクレオチドは、シトクロム P450 の CYP735A サブファミリーによって *trans*-ゼアチン (tZ) 型のヌクレオチドとなる (Takei et al., 2004)。その後、LONLEY GUY (LOG) タンパク質によって活性型である tZ や iP になる (Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009)。一方、サイトカイニンの不活性化は、酸化やグルコシル化など、いくつかの経路によって行われるが、主要なものはサイトカイニン酸化酵素/脱水素酵素 (CKX) による経路であり、塩基型とリボシド型のサイトカイニンが不可逆的に不活性化される (Jones and Schreiber, 1997; Mok and Mok, 2001; Werner et al., 2006)。

本章では、トマト果実発達期の内生サイトカイニンの定量分析とそれらの調節に関わ

る遺伝子群の発現解析を行い、その調節機構を明らかにすることを試みた。また、トマト果実形成におけるサイトカイニンの役割を調べるため、外生処理が果実発達に及ぼす影響を組織解剖学的に解析した。

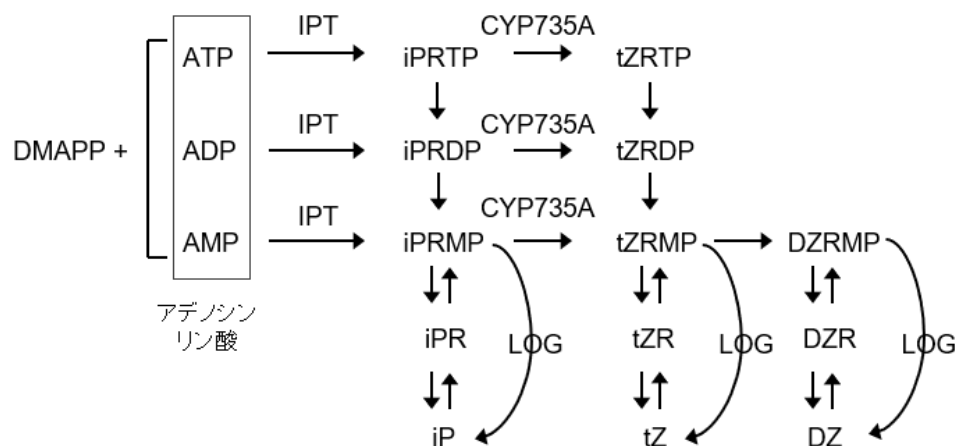


図 1 サイトカイニン生合成経路

DMAPP = ジメチルアリルピロリン酸; ATP = アデノシン 3 リン酸; ADP = アデノシン 2 リン酸; AMP = アデノシン 1 リン酸; tZ = *trans*-ゼアチン; iP = イソペンテニルアデニン; DZ = ジヒドロゼアチン; tZR = *trans*-ゼアチンリボシド; iPR = イソペンテニルアデノシン; DZR = ジヒドロゼアチンリボシド; iPRTP = iPR 5'-3 リン酸; iPRDP = iPR 5'-2 リン酸; iPRMP = iPR 5'-1 リン酸; tZRTP = tZR 5'-3 リン酸; tZRDP = tZR 5'-2 リン酸; tZRMP = tZR 5'-1 リン酸; DZRMP = DZR 5'-1 リン酸。

材料と方法

植物の栽培

本研究では、トマト品種の‘マイクロトム’と‘アイルサクレイグ’を使用した。マイクロトムは、矮性形質を持つトマトで、通常のトマトと比較して必要となる栽培スペースが小さいため、果実発達等の研究に広く用いられている (Serrani et al., 2007a; Wang et al., 2009; Carvalho et al., 2011)。栽培には園芸培土 (クレハ化学) を用い、人工気象室 (明期 28°C 14 時間、暗期 20°C 10 時間) 内で行った。遺伝子発現等の解析では、受粉時期を揃えるため、開花 2 日前に花から雄ずいを除去し、開花当日に手動で受粉を行ったものを受粉サンプルとして用いた。

内生サイトカイニンの分析

サイトカイニンの抽出は、Dobrev と Kaminek (2002) の方法に準じて行った。約 1 g の果実を液体窒素下で粉碎し、メタノール/水/ギ酸 (15 : 4 : 1, v/v/v) 10 mL を添加した。内部標準として、重水素ラベルしたサイトカイニン類 (OlchemIm) を添加し、-20°C で一晩静置した。遠心分離により抽出液を別容器に回収し、残った沈殿に新しい抽出液 10 mL を添加して 30 分間抽出し、1 回目の抽出液と合わせた。夾雑物除去のため、抽出液を 1M ギ酸で平衡化した Oasis HLB カラム (200 mg; Waters) に通過させ、溶出液を回収した。次に、カラムを 5 mL のメタノール/水/ギ酸 (15 : 4 : 1, v/v/v) で洗浄し、先の溶出液と合わせ、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。残渣を 1M ギ酸に溶解し、1M ギ酸で平衡化した Oasis MCX カラム (150 mg; Waters) に添加し、ホルモン類をカラムに吸着させた。カラムを 1M ギ酸で洗浄したのち、100%メタノールを添加して酸性物質を除去した。さらにカラムに 5 mL の 5%アンモニア水を添加し、溶出液を捨てた後、5%アンモニア水を含有した 60%メタノールを添加してサイトカイニン類を溶出させ、回収した。ロータリーエバポレーターを用いて溶出液から溶媒を除去し、残渣を水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS の分析に供した。

使用した LC/MS/MS は、Shimadzu Prominence 20A Series HPLC (島津製作所) と質量分析計 3200 Qtrap (AB Sciex) から構成され、イオン化は、エレクトロスプレー (ESI) で行った。HPLC カラムは、Shim-pack XR-ODS (2.2 μ m, 75 $\times$ 2.0 mm; 島津ジーエルシー) を用い、カラムオーブン温度は 45°C、流速は、0.2 mL/min に設定した。溶離液には、移動相 A 水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) と移動相 B 100%メタノールを使用した。HPLC の送液条件は、初期設定を移動相 A 100%とし、10 分間で移動相 A が 80%で移動相 B が 20%、続いて 5 分間で移動相 A、B 共に 50%、さらに 5 分間で移動相 B を 100%とし、その後、移動相 B 100%で 5 分間カラムを洗浄し、初期条件に戻した。定量は、multiple reaction monitoring (MRM) モードで行い、プロトン付加されたプレカー

サーイオン ($[M+H]^+$) と派生するプロダクトイオンを使用した。定量に用いたイオンの m/z を以下に示す。 $[^2H_5]tZ$ 225.2 > 137.0、 tZ 220.2 > 136.1、 $[^2H_5]tZR$ 357.2 > 225.1、 tZR 352.2 > 220.1、 $[^2H_6]iP$ 210.2 > 137.1、 iP 204.2 > 136.1、 $[^2H_6]iPR$ 342.2 > 210.1、 iPR 336.2 > 204.1、 $[^2H_3]DZ$ 225.2 > 136.1、 DZ 222.2 > 136.1、 $[^2H_3]DZR$ 357.2 > 225.1、 DZR 354.2 > 222.1。データ解析には、Analyst version 1.4.2 ソフトウェア (AB Sciex) を使用し、内生量と内部標準の比でサイトカイニン濃度を求めた。

サイトカイニン代謝酵素遺伝子の単離

トマトの IPT、CYP735A、LOG および CKX をコードする遺伝子の配列情報は、シロイヌナズナとイネの遺伝子配列をクエリーとして用い、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、SOL Genomics Network (SGN; <http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl>)、MiBASE (<http://www.kazusa.or.jp/jsol/microtom/indexj.html>) および Tomato SBM (<http://www.kazusa.or.jp/tomato/>) より得た。RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用してトマトの様々な器官から全 RNA を抽出し、RNase Free DNase I kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を除去した。Transcriptor First Strand cDNA 合成キット (Roche) を用いて全 RNA から First strand cDNA を合成した後、それらを混合し、表 1 に示したプライマーを用いてサイトカイニン代謝酵素遺伝子群の増幅を行った。得られた PCR フラグメントを pCR4Blunt-TOPO (サーモフィッシャー) にクローニングし、塩基配列解読を行った。

リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は、定量リアルタイム PCR 法で実施し、内在性コントロールにはトマトのリファレンス遺伝子として広く使用されている *SAND* 遺伝子を使用した (Expósito-Rodríguez et al., 2008)。遺伝子単離と同様の方法により、トマトの各サンプルから抽出した RNA から First strand cDNA を合成し、鋳型に用いた。反応は、*SIIPT*, *SICYP735A*, *SILOG* および *SICKX* 遺伝子の解析には、ユニバーサルプローブライブラリ (Roche) と LightCycler480 プローブマスター (Roche) を、*SAND* 遺伝子には、LightCycler 480 SYBR GREEN I マスター (Roche) を用いた。機器は LightCycler 480 (Roche) を用い、LightCycler480 プローブマスターの温度条件は、95°C/5 min (1 サイクル); 95°C/10 秒, 60°C/30 秒, 72°C/1 秒 (45 サイクル)、LightCycler 480 SYBR GREEN I マスターは、95°C/5 分 (1 サイクル); 95°C/10 秒, 60°C/10 秒, 72°C/10 秒 (45 サイクル) とした。用いたプライマーの配列を表 2 に示す。

サイトカイニン処理

トマト子房への外生サイトカイニン処理では、CPPU、tZ、カイネチンおよびベンジ

ルアミノプリンを溶媒（0.1% tween20 含有 5%エタノール液）に溶解し、それぞれ子房 1 個あたりに 20 μ L を処理した。対照区には、サイトカイニンを含まない溶媒を同量処理したものを用いた。処理 20 日後の果実をサンプリングし、重量測定と顕微鏡観察を行った。

顕微鏡観察

顕微鏡観察に用いた果実等のサンプルは、観察に適した大きさにスライスし、FAA 液（ホルマリン/酢酸/50%エタノール=1/1/18）に浸漬して組織を固定した。固定後のサンプルは、*tert*-ブチルアルコールで脱水し、Paraplast Plus（McCormick Scientific）で包埋した。包埋したサンプルをマイクロトームで 8 μ m の厚さにスライスし、エタノールシリーズでパラフィンを除去した後、0.1% のトルイジンブルーO で染色し、光学顕微鏡（DM2000、ライカマイクロシステムズ）で観察した。解析には、顕微鏡イメージングソフトウェア（Leica Application Suite、ライカマイクロシステムズ）を使用した。細胞層数の測定は、果皮の内側から外側に向かって垂直に線を引き、線上の細胞数をカウントして行った。

表 1 サイトカイニン代謝酵素遺伝子の増幅に使用したプライマー

遺伝子	PCR プライマー	
	Forward	Reverse
<i>SIPT1</i>	taaatagtaacagtagcattacaagtag	gaagaaaaatatgggtgaattagctgg
<i>SIPT2</i>	attattttactgtgcatataaatagttgc	agagctggaaatagctggaaatgac
<i>SIPT3</i>	tttgtaattaactaacacgacgatg	gtaaacatgtggacaattcttctag
<i>SIPT4</i>	tcgatcccgatttttgagattgag	gatgtgttttgacgatcaactttgc
<i>SIPT5</i>	cttctgtcactgaaaacattaaccc	aggttctttgtgcttttcgctctg
<i>SIPT6</i>	caatcgggccagttgctccagtc	aagtgaagacaaagtccttagatg
<i>SICYP735A1</i>	cattggaacaattgtatactaaaagtaac	taatcctctaatagacaaaaattaatttc
<i>SICYP735A2</i>	tggataaagagtaatagttgtaaccatc	taatcctctaatagacaaaaattaatttc
<i>SILOG1</i>	aaagcaactactcaacacacatattag	gtttgagcactgttttctgcagtc
<i>SILOG2</i>	gcctctatatatatattgtctctc	gaggagaaaaagtaaagcttggtag
<i>SILOG3</i>	cctcttctgcttctcaatttcaaag	gcttttcccatcaacatcttaagtc
<i>SILOG4</i>	tctatcaaagtactcaataaaatctatc	caacatctctcttgcactctaaaacc
<i>SILOG5</i>	ctaategcctaaaactatgggggtg	cacaaaacagtgcgtccattgacc
<i>SILOG6</i>	gattctattttatcatctaatttgcagg	caggtagcttgcctccagtaatacg
<i>SILOG7</i>	ttgcaacttcttctcttttctctcg	caaaacctatactaaaataaaaaagtac
<i>SILOG8</i>	cattatattcccacatatacagaagag	ctgaaaaataacttatacattactgattg
<i>SICKX1</i>	ccaaaaattactcaattaatcagagcc	aatgtaaaacttgacctatctacaag
<i>SICKX2</i>	taagttgactctaccactcatataatc	atgtgcagaaaaggcataagaagtag
<i>SICKX3</i>	atcacattctcaagttcacaatggtac	gaaattaagaatgtagtacattcattcc
<i>SICKX4</i>	gtctctctatatacacgaatccttac	atacactaaacacgatcctatcaaatc
<i>SICKX5</i>	tgtgtcaacaaccacttttaagaaagaatg	ctgaatctttaatcaaatccctaagc
<i>SICKX6</i>	cttctattatggctaagttttttatcc	ttaccaccctatagccttataggacg
<i>SICKX7</i>	caactctctatactatcaaaaaagggc	cgtccactcaagaatgtacatttg
<i>SICKX8</i>	cttctaatacttttcttttcttctc	ctttactccctatgcttatatcctac

表 2 第 2 章で実施したリアルタイム PCR に使用したプライマー

遺伝子	PCR プライマー	
	Forward	Reverse
<i>SIPT1</i>	ccaagcatgaagattgtgaaac	aatatgggtgaattagctggaaaacc
<i>SIPT2</i>	gagtgctaattcattccaacacg	gctgatataaccacattacgagtc
<i>SIPT3</i>	tttcgcggtgaaaaacttct	tgcaagaagggaagttgacga
<i>SIPT4</i>	agagttcaccactaaaaactttgc	ccgcggttggttatagagtt
<i>SIPT6</i>	gatgttccaaaagcctctcg	taaacttgcaagctctgagtcg
<i>SICYP735A1</i>	tcctgctttcatcgagataa	tgatcggagcaaccacta
<i>SICYP735A2</i>	aacctcgatttctgttgaaa	tgaagttgattcggagacga
<i>SILOG1</i>	aaatttgtgtgtttgtgggag	agctcaactgcagcctcttt
<i>SILOG2</i>	agctgtggaggaaggttca	ttgctgttggtgcagatacg
<i>SILOG3</i>	tgggcctagtttctcaatcag	tttaggaatcaccctaacacg
<i>SILOG4</i>	gacaaaggtgtggaagaagga	gctctttgggtgatgtagctg
<i>SILOG5</i>	catgttgctcccatgaaa	tggagactgctccttgat
<i>SILOG6</i>	catgaaggagttgcttctaagttg	gtgcctgagggttaaccaagt
<i>SILOG7</i>	gcaaagaactggaggagagg	agtcccatcaacccacac
<i>SILOG8</i>	tgagcttggaagagaaatagatcaa	aaacccatcaaccaatgct
<i>SICKX1</i>	gaaatggtatcaatggccctat	tcgattatcccacttgctacg
<i>SICKX2</i>	tggtcacaaatgggatgttt	aggagcaagcatggctaaag
<i>SICKX3</i>	agagaagccgttagccgtta	aatgcatgctttatcacctgac
<i>SICKX4</i>	tgggacgatagaagttcggtta	tcaaaaacgcgaccaagtaa
<i>SICKX5</i>	gaaggatttcggcaacagat	gaaaccgatttcggatacaga
<i>SICKX7</i>	cttcacctactgttggtggt	cgtgcttaaaagcttgcca
<i>TRR3/4</i>	cgtcccctaagcattctca	cgtcttgggtgatgttgg
<i>TRR8/9a</i>	tgcttagaagaaggggcaga	gggggcttttacattggtt
<i>TRR8/9b</i>	agtatgccggaatgactgg	tggaacattttccgatgaca
<i>TRR16/17</i>	ggtctaaggcggttgagta	tcctggcatgcaataatctg
<i>TRR7/15</i>	gagggggatgacaacaaaga	tgattgtgtcgttgatcgt
<i>SAND</i>	ttgcttgagggaacagacg	gcaaacagaaccctgaatc

結果

果実形成期のサイトカイニン類の動態

トマトの果実発達とサイトカイニン含量の関係を解析するため、発達過程にあるマイクロトム果実の塩基型とリボシド型のサイトカイニンの濃度を測定した（図 2）。塩基型サイトカイニンの tZ は、開花後に濃度が上昇し、5 日後にピークとなり、徐々に減少した。一方で、同じく塩基型の iP の濃度は、開花 2 日前から開花当日は、ある程度高いが、開花後に減少した。DZ は、開花前は検出されず、開花当日から 5 日後に増加し、その後減少した。リボシド型のサイトカイニン類（tZR、iPR および DZR）の含量は、3 分子種ともに開花前は塩基型のサイトカイニンと比較して非常に高く、開花当日にピークとなり、その後急速に減少した。

トマトのサイトカイニン代謝酵素遺伝子群

本研究開始時ではトマトのサイトカイニン代謝に関わる酵素の遺伝子の報告は無かったことから、それらの情報を得るためにシロイヌナズナおよびイネで報告されている遺伝子の推定アミノ酸配列を用いてトマトのデータベースの検索を行った。得られた配列情報をもとに特異的プライマーを作製し、RT-PCR によりトマトのサイトカイニン代謝酵素遺伝子の cDNA を単離した。

6 種類の IPT 様の cDNA を単離し、*SIIPT1-6* と名付けた。これらの推定されるタンパク質のアミノ酸残基数は、323~449 であった。これらのうち、*SIIPT5* の配列には、他の遺伝子から推定される翻訳終結位置よりも前に停止コドンが入っており、正常なタンパク質が翻訳されないと考えられた。IPT ファミリー内での推定アミノ酸配列の相同性は、17.2%から 51.4%であった。そのうち、*SIIPT6* のアミノ酸配列は、シロイヌナズナ *AtIPT9* および *OsIPT10* と相同性が高かった（それぞれ、60.8%と 54.2%、図 3A）。これらのタンパク質は、tRNA のイソプレニル化反応を触媒し、*cis*-ゼアチンタイプのサイトカイニンの合成に関与していることが知られていることから（Miyawaki et al., 2006）、*SIIPT6* がコードするタンパク質も、同様の機能を持つ酵素であると考えられる。

2 種類の CYP735A サブファミリー様の cDNA を単離し、*SICYP735A1* および *SICYP735A2* と名付けた（図 3B）。これらの推定されるタンパク質のアミノ酸残基数は、いずれも 516 残基であり、アミノ酸配列の相同性は非常に高く、95.2%であった。

8 種類の LOG 様の cDNA を単離し、*SILOG1-8* と名付けた。これらの推定されるタンパク質のアミノ酸残基数は、191-234 であり、遺伝子ファミリー内での推定アミノ酸配列の相同性は、59.8%から 92.7%であった。シロイヌナズナおよびイネの遺伝子群の推定アミノ酸配列と比較したところ、*SILOG1,2,3,6* および 8 は、クレード I に属し、*SILOG4* および 5 は、クレード II に属していた（図 3C）。

8 種類の CKX 様の cDNA を単離し、*SICKX1-8* と名付けた (図 3D)。*SICKX6* と *SLCKX8* は、RT-PCR でいくつかのスプライスバリエントが認められ、得られた全ての配列において、他の遺伝子から推定される翻訳終結位置よりも前に停止コドンが入っていたことから、正常なタンパク質が翻訳されないと考えられたため、以降の解析から除外した。*SICKX6* と *SICKX8* 以外の推定アミノ酸残基数は、519-543 であり、遺伝子ファミリー内での配列相同性は、30.5%から 83.81%であった。

サイトカニン代謝酵素遺伝子群のトマト器官での発現

単離したサイトカニン代謝酵素遺伝子群のトマト各器官における発現解析を行った (図 4)。*SIPT1* と *SIPT2* は、主に花、花芽および若い果実で発現しており、*SIPT3* と *SIPT4* は、若い果実以外の器官で発現していた。*SIPT6* は、解析に用いたほぼ全ての器官で一様に発現していた。

SICYP735A1 は、主に根、花、および若い果実で発現していた。一方で、*SICYP735A2* の主要な発現部位は、葉、根、および若い果実であった。

SILOG1 は、主に葉、*SLOG2* は花および花芽、*SILOG4* は根、*SILOG8* は主に花で発現していた。*SILOG3*、*SILOG5*、*SILOG6* および *SILOG7* は、ほぼ全ての器官で発現していたが、若い果実での発現が低かった。

SICKX1 は、解析に用いたほぼ全ての器官で発現していたが、若い果実での発現は低かった。*SICKX2* は主に花、*SICKX3* は根で高く発現していた。*SICKX4* は、主に葉、花、花芽および若い果実で発現していた。*SICKX5* は、解析に用いたほぼ全ての器官で発現していた。*SICKX7* は、主に若い果実で発現していた。

サイトカニン代謝酵素および応答遺伝子群の果実形成期での発現

トマトの果実形成とサイトカニンの代謝との関係を知るため、発達中の果実におけるサイトカニン生合成および不活性化酵素遺伝子群の発現解析を行った (図 5)。*SIPT1* の発現は、開花 2 日前の子房での発現は低いが、受粉後に徐々に増加し、開花 5 日後に高くなり、その後減少するが、開花 20 日後に再び増加した。未受粉の子房では、発現は増加しなかった。*SIPT2* は、開花 2 日前に比較的高い発現を示し、一旦低下するが、開花後に徐々に増加し、開花 5~10 日後にピークとなり、その後減少した。*SIPT3* と *SIPT4* は、開花前から開花 3 日後は比較的高い発現を示すが、その後急減した。*SIPT6* は、果実発達期で発現はほとんど変化しなかった (データ略)。

SICYP735A1 は、開花 2 日前の発現は低いが、開花 1 日後に急増し、その後減少した。一方、*SICYP735A2* は、開花当日までの発現は低く、受粉後に徐々に増加し、開花 5 日後にピークとなり、その後減少するが、開花 20 日後に再び増加した。*SICYP735A1* と *SICYP735A2* とともに、未受粉の子房の発現は低かった。

SILOG2 の発現は、開花前は低いが、受粉後に徐々に増加し、開花 3 日後にピークと

なり、その後減少した。未受粉の状態では、発現は低いままであった。*SILOG6* は、開花前から開花 3 日後は比較的高い発現を示すが、その後急減した。*SILOG8* は、開花前の発現は低い、開花当日に急増し、その後減少した。他の *LOG* 遺伝子は、果実発達中は発現がほとんど変動しなかった。

SICKX1 は、開花前は比較的高い発現を示すが、その後減少した。*SICKX3* の発現は、開花前は低い、受粉後に徐々に増加し、開花 10 日後にピークとなり、その後減少した。未受粉の子房は、発現が低いままであった。*SICKX4* は、開花前の発現は低い、開花 1 日後まで徐々に増加し、開花 5 日後に減少するが、開花 20 日後に再び増加した。*SICKX7* は、開花前の発現は低い、開花当日に急増し、その後減少するが、開花 15 日後に再び増加した。他の *CKX* 遺伝子は、果実発達中は発現がほとんど変動しなかった。

果実発達中のサイトカイニンシグナルの変動を解析するため、サイトカイニン応答のマーカーとして知られているトマトタイプ A レスポンズレギュレーター遺伝子 (*TRRs*; Shani et al., 2010) の発現を解析した (図 5)。解析した 5 つの *TRR* 遺伝子 (*TRR3/4*, *TRR8/9a*, *TRR8/9b*, *TRR7/15* および *TRR16/17*) の発現は、開花 2 日前から 5 日後の間は高く、その後減少した。

サイトカイニン処理のトマト果実形成への影響

トマト果実形成におけるサイトカイニンの役割を調べるため、4 つの異なる種類のサイトカイニン (tZ、BA、カイネチンおよび CPPU) をマイクロトム子房に処理し、着果や果実の成長に及ぼす影響を解析した (図 6)。Serrani ら (2007a) の報告と同様に、マイクロトムの子房は、受粉やホルモン処理がされない場合、落果はしないが、果実肥大は起こらなかった。一方、サイトカイニン類のうちの CPPU 処理は、果実を肥大させた (図 6A)。CPPU を 1000ng および 10000ng 処理した子房は、全て単為結果果実を形成し、処理量依存的に肥大効果が増大した。しかしながら、果実重量は、10000ng 処理したもので受粉果の約半分であった (図 6B)。CPPU 処理で得られた果実の子室は、ゼリー様の物質で満たされており、いくつかの胚珠様組織が確認されたが、それらは十分に発達していなかった (図 6D)。

果実の切断面を確認したところ、CPPU 処理で肥大した果実では受粉果実と比較して果皮の面積が小さく (図 7C)、果実サイズが減少する大きな原因と考えられた。果皮切片の顕微鏡観察を行ったところ、CPPU 処理果実の細胞の大きさは、受粉して肥大した果実の約半分であったが (図 7A, B, D)、細胞層数はほぼ同じであった (図 7E)。以上のことから、CPPU 処理で肥大した果実のサイズが受粉果実よりも小さい原因は、細胞が小さいためであると考えられた。

CPPU 処理果実では、果柄と萼が肥大していた (図 8A)。これらの部位の切断面の組織を観察したところ、果柄の道管と篩管および篩管により囲まれている部分が大きく肥大しており、それらの細胞は、受粉果よりも大きくなっていた (図 8B-E)。CPPU 処理

果実の果皮の細胞は、受粉果実よりも小さいことから、CPPU 処理の細胞成長への影響は、組織によって異なることが示唆された。

CPU 処理がマイクロトム以外のトマトへ及ぼす効果を調べるため、非矮性品種のアイルサクレイグに処理を行い、果実肥大への影響を確認した（図 9A）。マイクロトムと異なり、アイルサクレイグでは、未処理の子房は、開花 5 日から 10 日後に老化し、落果したが、CPU 処理した子房は、老化・落果しなかった。CPU 処理の果実肥大への効果は、マイクロトムと比較してやや弱く、その重量は、受粉果の約 5 分の 1 であった（図 9B）。また、マイクロトムと同様に、アイルサクレイグでも果柄の肥大が確認された（図 9C）。

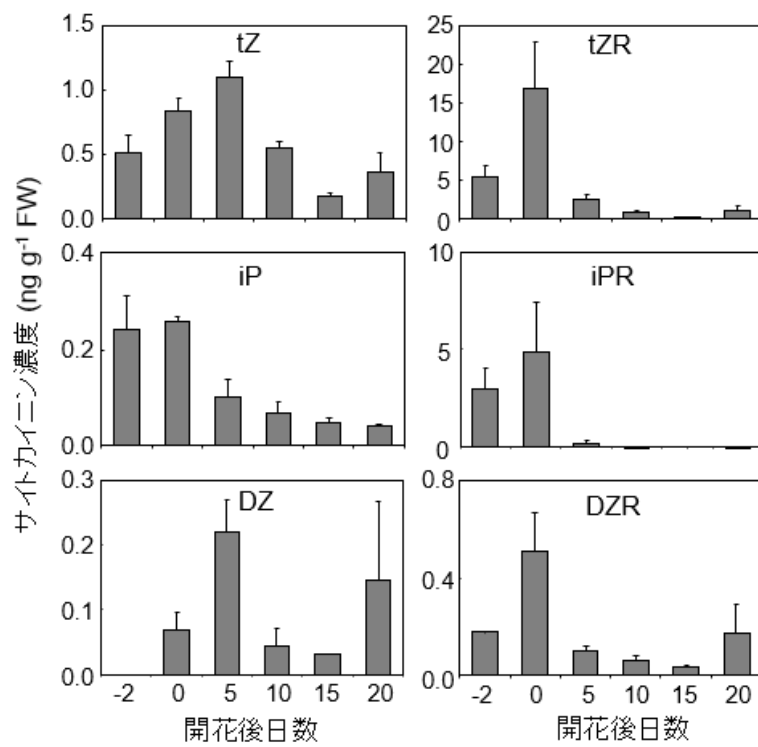


図2 トマトの果実発達期におけるサイトカイニン類の動態 (平均値±標準誤差, $n = 3$)

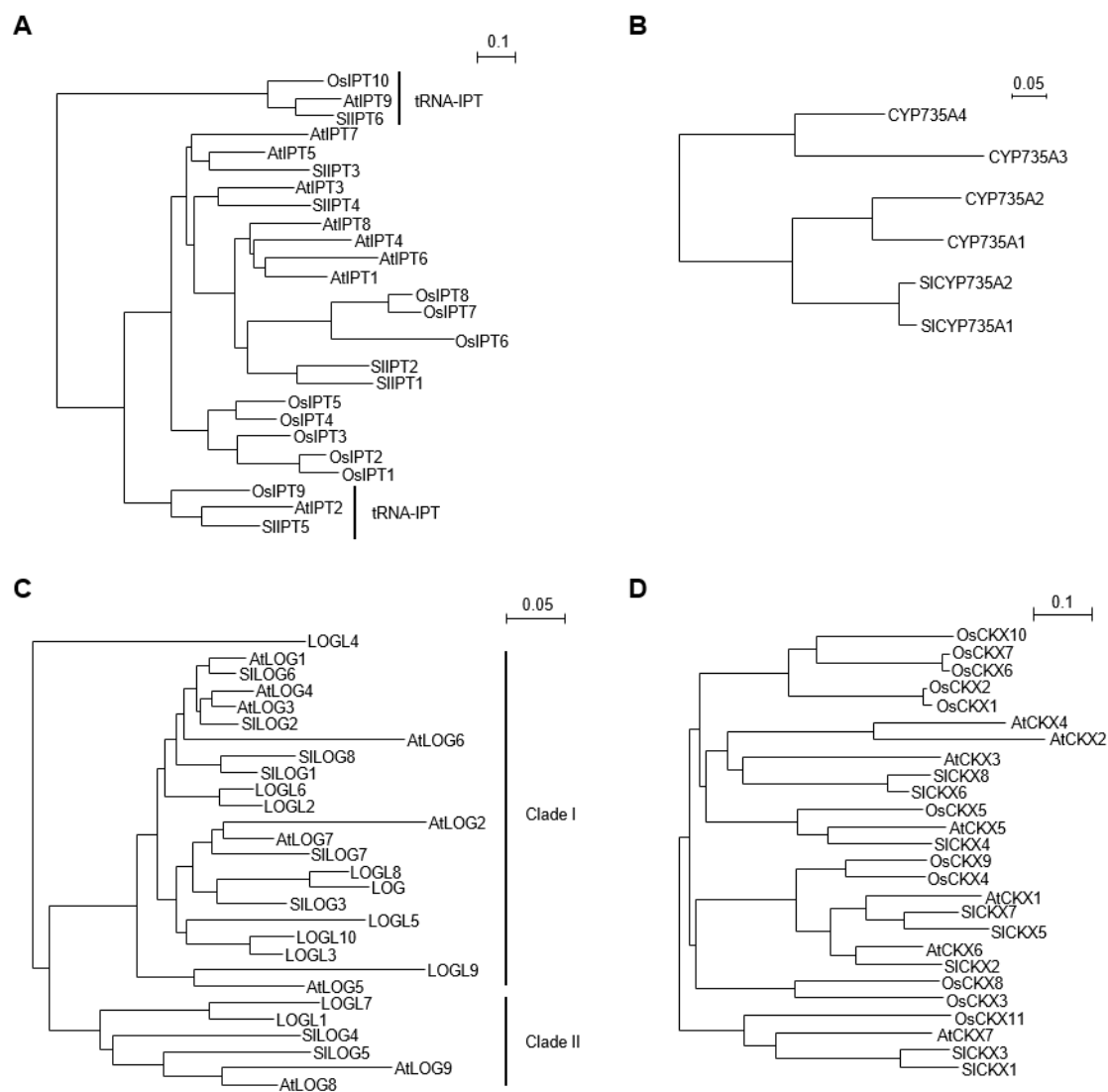


図3 トマトサイトカイニン代謝酵素の系統樹

- A) IPT の推定アミノ酸配列の系統樹。
 B) CYP735A の推定アミノ酸配列の系統樹。
 C) LOG の推定アミノ酸配列の系統樹。
 D) CKX の推定アミノ酸配列の系統樹。

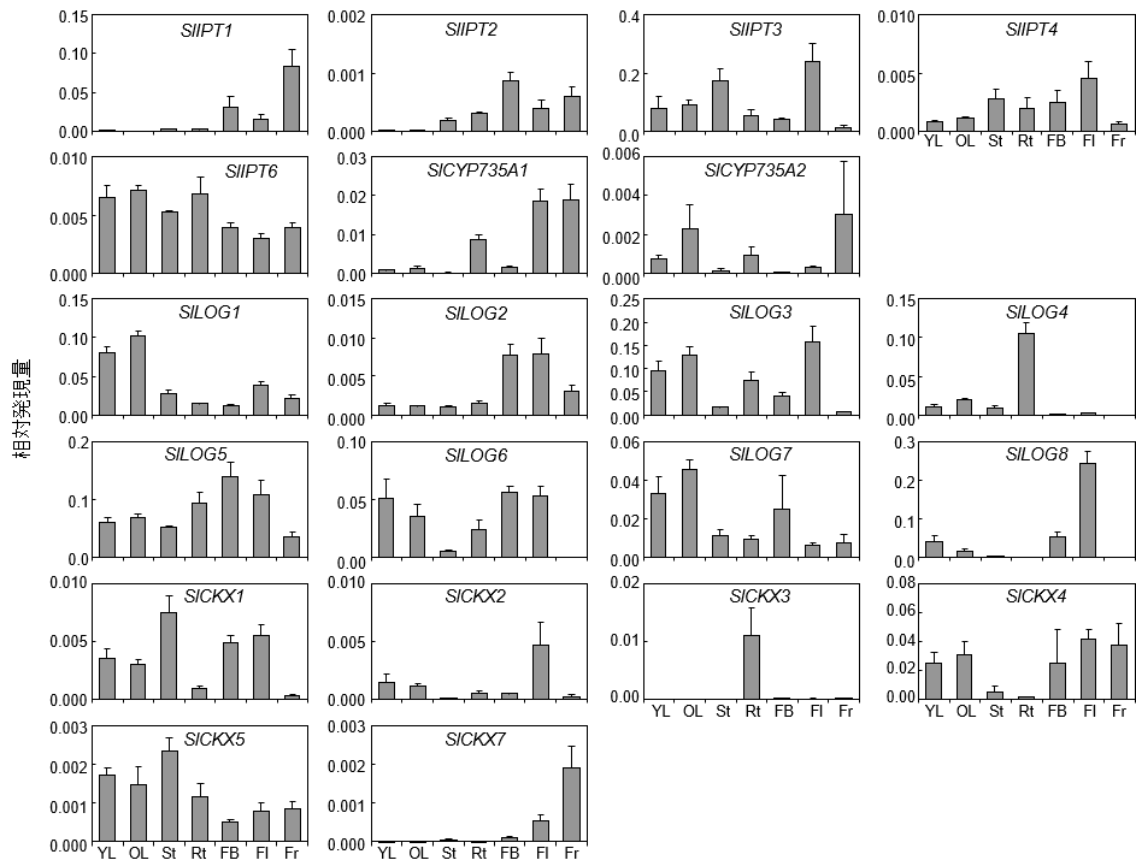


図4 トマトの各器官におけるサイトカニン代謝酵素遺伝子の発現（平均値±標準誤差， $n = 3$ ）

リアルタイム PCR は、各器官より抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。YL = 未熟葉; OL = 成熟葉; St = 茎; Rt = 根; FB = 花芽; Fl = 花; Fr = 開花 20 日後の果実。

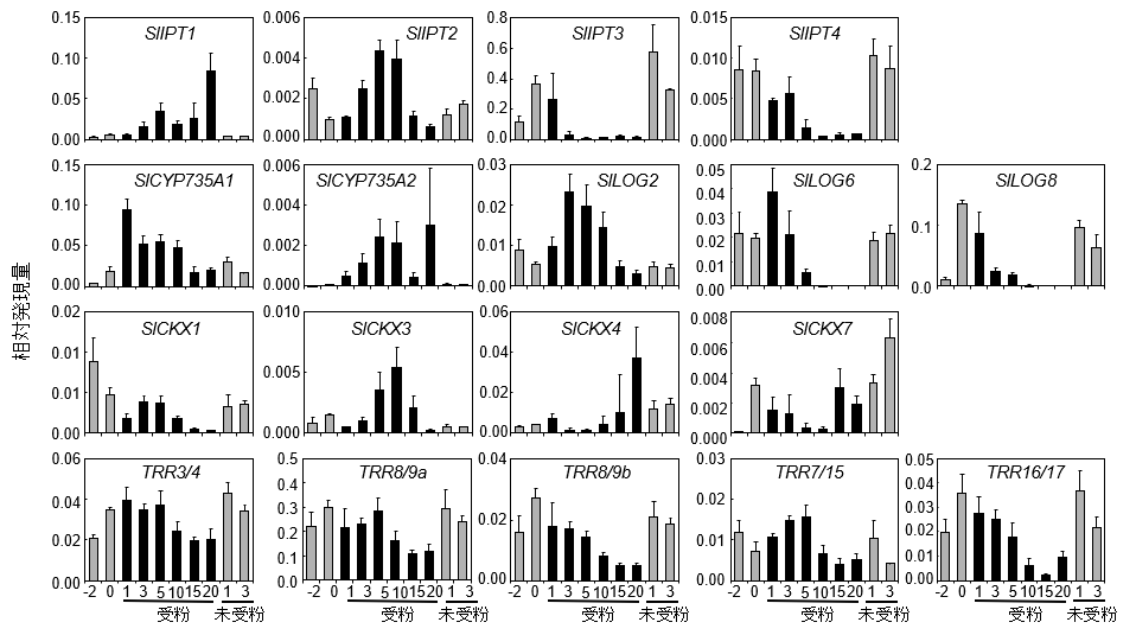


図5 トマトの果実発達期におけるサイトカイニン代謝酵素遺伝子および応答性遺伝子の発現 (平均値±標準誤差, $n=3$)

リアルタイム PCR は、授粉 (黒) および未授粉 (灰色) の子房より抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。

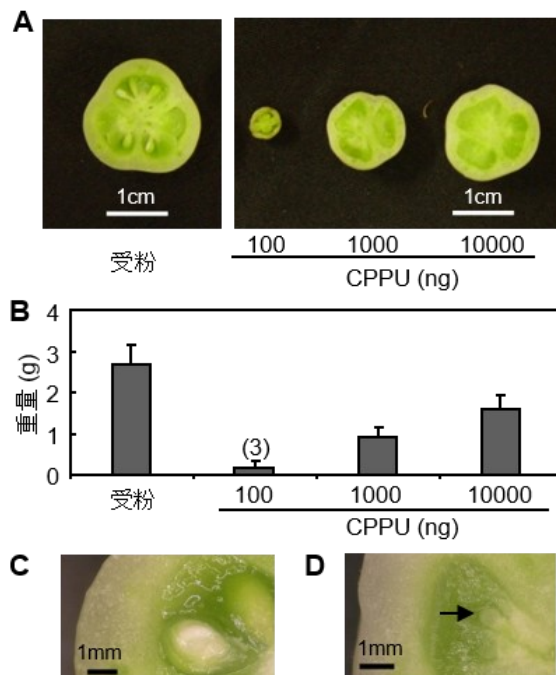


図 6 CPPU 処理がトマトの果実肥大に及ぼす影響

A) 授粉果実 (左) と CPPU 処理果実 (右) の切断面。数字は、CPPU の処理量を示す。

B) CPPU 処理が果実重量に及ぼす影響 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n=8$)。図の括弧は、8 個処理したうちの肥大した果実数を示す。

C, D) 授粉果の種子 (C) および CPPU 処理果実 (10000ng 処理) の胚珠様組織 (D)。

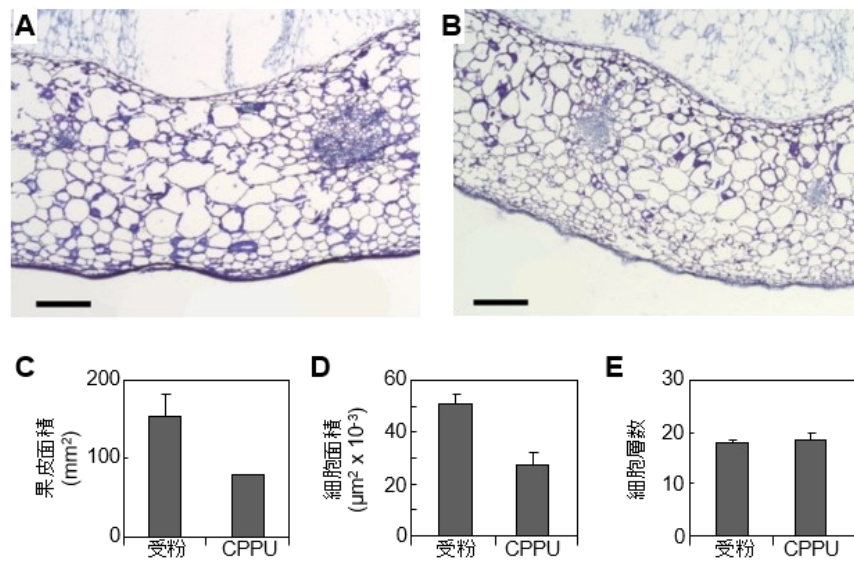


図7 CPPU 処理がトマトの果実組織に及ぼす影響

A, B) 授粉果実 (A) と CPPU 処理果実 (B) の果皮断面 (スケールバー = 500μm)

C-E) 授粉果実と CPPU 処理果実横断面の果皮面積 (C)、平均細胞面積 (D)、果皮細胞層数 (E) (平均値±標準偏差, $n = 9$)

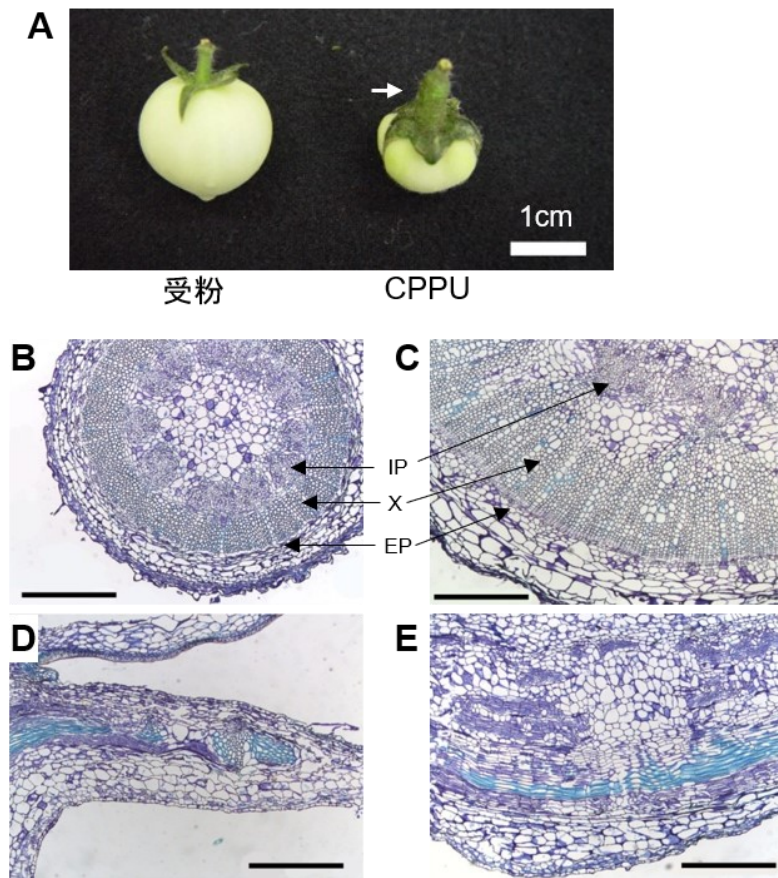


図 8 CPPU 処理がトマトの果柄と萼に及ぼす影響

A) 開花 20 日後の受粉果実と CPPU 処理果実（子房 1 個あたり 10000ng 処理）。矢印は、肥大した果柄と萼を示す。

B, C) 受粉果実 (B) および CPPU 処理果実 (C) の果柄の横断面（スケールバー = 500μm）。

IP = internal phloem; X = xylem; EP = external phloem

D, E) 受粉果実 (D) および CPPU 処理果実 (E) の萼の縦断面（スケールバー = 500μm）。

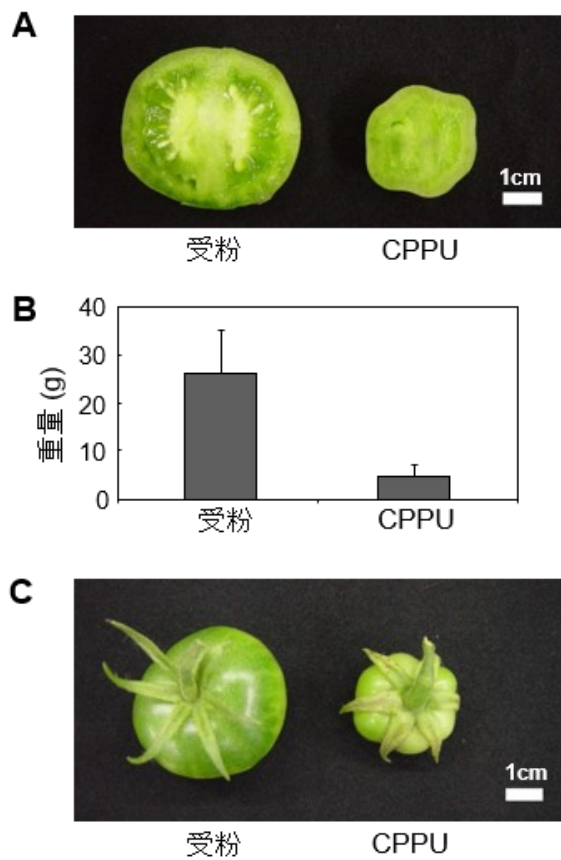


図 9 CPPU 処理がトマト‘アイルサクレイグ’の果実肥大に及ぼす影響

- A) 授粉果実および CPPU 処理果実（子房 1 個あたり 10000ng 処理）の断面。
- B) 授粉果実および CPPU 処理果実の重量（平均値±標準誤差, $n = 8$ ）。
- C) 授粉果実および CPPU 処理果実。CPPU 処理果実では、花柄部分が肥大している。

考察

トマト果実発達期の内生サイトカイニンの調節

本研究の結果から、トマトの果実発達期における内生サイトカイニンは、化合物の種類によって動態が異なることが明らかとなった（図 2）。子房内のリボシド型サイトカイニンと iP の濃度は開花当日に高く、その後減少した。これらと同様に、サイトカイニン生合成酵素遺伝子の *SHIPT3*、*SHIPT4*、*SILOG6* および *SILOG8* の発現は開花当日に高く、その後急速に減少した（図 5）。また、*SICYP735A1* の発現は、開花前から当日にかけてやや増加していた。これらの結果は、未受粉の開花当日の子房において、前駆体のアデノシンリン酸から活性型サイトカイニンが生合成されていることを示している（図 1 生合成経路参照）。

iP やリボシド型サイトカイニンと異なり、tZ や DZ の濃度は開花後も上昇し、5 日後にピークとなり、その後減少した。これらと同様に、サイトカイニン生合成酵素遺伝子の *SHIPT1*、*SHIPT2*、*SICYP735A1*、*SICYP735A2*、および *SILOG2* の発現は、受粉後に上昇し、開花 1 日から 5 日後に高い発現を示した。興味深いことに、*SICYP735A1* の開花 1 日後の発現は根での発現の約 10 倍であった。これは、受粉後の子房でサイトカイニン *trans*-水酸化活性が強く誘導され、tZ 型のサイトカイニンが特異的に生合成されていることを示している。一般的に、根はサイトカイニンを生合成する主要な器官であり、根で合成されたサイトカイニンが様々な器官に輸送され、多様な成長過程に関与していると考えられている（Hirose et al., 2008）。また、Ghanem ら（2011）は、遺伝子組換えで根のサイトカイニン生合成を促進させたトマトでは地上部の発達が促進し、果実の収量が増加することを報告している。一方、局所的なサイトカイニン生合成も腋芽の発達などで重要な役割をしていることが示唆されている（Tanaka et al., 2006）。本研究で示されたトマト子房におけるサイトカイニン代謝酵素遺伝子群の特徴的な発現様式は、初期の果実発達においては、時期および部位特異的なサイトカイニン生合成が重要であることを示唆している。

サイトカイニン応答性の *TRR* 遺伝子群の発現が開花 2 日前から 5 日後まで高く、その後低下したことは、サイトカイニンシグナルが開花前と開花後初期に高いことを示唆している。これらの発現とサイトカイニン各分子種の動態から、トマトの果実形成初期にはサイトカイニンが増加する 2 つのピークがあると考えられる。1 つ目のピークは開花当日であり、いくつかの生合成酵素遺伝子群の発現がこの時期特異的に高いことから、このピークは受粉とは関連していないと考えられる（図 5）。開花当日の高濃度のサイトカイニン蓄積はキウイフルーツでも確認されており、トマトと同様に開花後に低下する（Lewis et al., 1996）。開花までの子房の発達には果実原基の細胞分裂の活性化や維持のための因子が必要であること（Gillaspy et al., 1993）、Bohner と Bangerth（1988）は

開花までの細胞分裂が果実の大きさに影響することを示唆していることから、受粉前の高濃度のサイトカイニンの子房の成長や維持のための役割を持つと考えられる。未受粉の子房に蓄積するサイトカイニンの特徴は、リボシド型サイトカイニンの濃度が高い事であり、これらは塩基型よりも約 10 倍高かった (図 2)。塩基型よりは弱い、リボシド型サイトカイニンもサイトカイニン受容体と結合能を持ち、活性型としての機能を持つと報告されている (Spíchal et al., 2004)。また、シロイヌナズナでは、サイトカイニン受容体タンパク質は 3 分子種確認されているが、それぞれの受容体はサイトカイニン各分子種へのリガンド特性と発現様式の違いから異なる役割を持つことが示唆されている (Stolz et al., 2011)。以上のことから、リボシド型サイトカイニンは、受粉前の子房の成長や維持に重要な役割を持つ可能性が考えられる。

内生サイトカイニンの 2 つ目のピークは、開花 5 日後の tZ の上昇によるものであるが、これは、果実発達のフェイズIIの時期と一致することから、増加した tZ は、受粉後の細胞分裂促進に関与していると考えられる。受粉後の内生サイトカイニン含量の増加は、トウモロコシやキウイフルーツなどの他の植物でも確認されている (Lewis et al., 1996; Emery et al., 2000; Tarkowski et al., 2006; Brugière et al., 2008; Rijavec et al., 2011)。興味深いことに、tZ とは逆に iP の濃度は開花後に低下したこと (図 2)、開花後の果実発達には、塩基型サイトカイニンのうちの iP ではなく tZ が重要であると考えられる。iP 型と tZ 型サイトカイニンの変換には *trans*-水酸化反応を触媒する CYP735A サブファミリーが関与しており、これをコードする *SICYP735A1* と *SICYP735A2* の発現は、受粉後に急増することから (図 5)、この P450 は受粉前後のサイトカイニンの選択的な調節に重要な役割を持つと考えられる。tZ と iP は植物が共通して持つ内生の活性型サイトカイニンとして認識されているが、その側鎖の違いによる生理的な役割は十分に解明されていない。今後、果実発達における異なるサイトカイニン分子種の役割の解明には、CYP735A サブファミリーの機能解析が重要であると考えられる。

開花 20 日後には比較的高い tZR と DZR 含量およびサイトカイニン代謝酵素遺伝子の発現が見られることから、この時期に 3 番目のサイトカイニン増加のピークがあると考えられる。果実発達後期のサイトカイニン増加は、野生種のトマトやキウイフルーツでも報告されている (Bohner and Bangerth, 1988; Lewis et al., 1996)、これらの果実形成への役割や細胞分裂等との関係は、現在のところ不明である。

サイトカイニン処理の効果

未受粉の子房への CPPU 処理は果実を肥大させた (図 6、9)。CPPU 処理で肥大した果実の大きさは受粉で肥大した果実よりも小さく、果皮の細胞も小さかったが、細胞層の数は、ほぼ同じであった (図 7A,B,D,E)。このことから、CPPU 処理による果実の肥大は、細胞肥大によるものではなく、主に細胞数の増加、すなわち細胞分裂促進によるためと考えられる。これは、トマトの果実発達においてサイトカイニンが細胞分裂に関

与していることを強く示唆している。Serrani ら (2007a) は、オーキシシンや GA 処理で肥大したトマト果皮の細胞は、受粉果の細胞と同等以上の大きさであることを報告しており、オーキシシンは主に細胞分裂、GA は細胞肥大に関与していると示唆している。CPPU 処理で肥大した果実が受粉果よりも小さいことは、細胞肥大が果実の最終的な大きさを決定するために重要であり、CPPU 処理果実がさらに肥大するには、オーキシシンや GA などの働きが必要であることを示唆している。

CPPU 処理果実では果柄の肥大が確認されたが、この肥大は細胞分裂と細胞肥大の両方の促進によるものであった (図 8C)。He と Saedler (2007) は、ベンジルアミノプリンと GA₃ の同時処理がホオズキ (*Physalis floridana*) の果柄を肥大させることを報告しており、これにはサイトカイニンが細胞分裂、GA が細胞肥大に関与していることを示唆している。このことから、CPPU 処理による果柄の細胞肥大促進には GA 等の作用が介している可能性が考えられる。CPPU 処理による離層部分を含む果柄の肥大は、この部位がサイトカイニンに対して高い感受性を持つことを示している。シロイヌナズナでは、果実の離層においてサイトカイニン生合成や応答に関わる遺伝子が特異的に発現していることが報告されており、サイトカイニンがこの部位の発達や維持に必要であることを示唆している (Miyawaki et al., 2004; Hirose et al., 2008; Kuroha et al., 2009)。一方、受粉後のトマトの初期の果実発達では、子房で合成されたオーキシシンが果柄に移動・蓄積し、子房の脱離を防ぐ働きをしていると考えられている (Nishio et al., 2010)。シロイヌナズナでは、サイトカイニンはオーキシシン輸送に関わる PIN タンパク質の勾配に関わっていることが報告されていることから (Pernisová et al., 2009; Růžicka et al., 2009)、離層におけるサイトカイニンもオーキシシン輸送に関わり、子房の脱離を防いでいる可能性が考えられる。また、CPPU 処理果実の組織観察では、果柄の道管および篩管の明瞭な肥大が確認された (図 8C)。果実の発達には、葉などの栄養器官から道管や篩管を通して水分や養分および光合成産物等が輸送されることが重要である (Ho et al., 1987; Van Ieperen et al., 2003)。サイトカイニンは篩管や道管発達に重要な役割を持つ植物ホルモンであることから (Matsumoto-Kitano et al., 2008; Nieminen et al., 2008)、トマトでは果柄の道管や篩管の発達を通して果実形成促進に関与していると考えられる (図 10)。

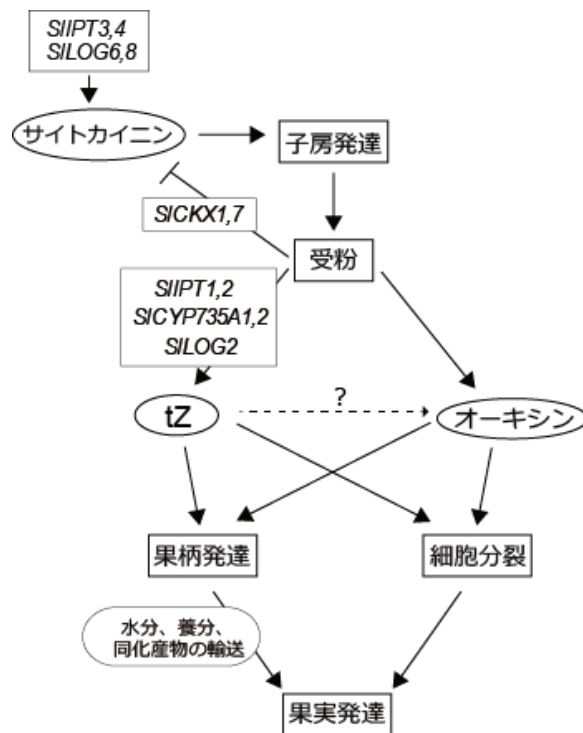


図 10 トマト果実発達におけるサイトカイニンの役割と調節のモデル

受粉前には、サイトカイニン生合成酵素遺伝子 (*SIIPT3*, *SIIPT4*, *SILOG6*, *SILOG8*) の発現により、高濃度のサイトカイニンが蓄積しており、未受粉の子房の発達に関与している。これらは受粉後に減少するが、別の生合成酵素遺伝子 (*SIIPT1*, *SIIPT2*, *SICYP735A1*, *SICYP735A2*, *SILOG2*) の発現上昇により、tZ はその後も上昇し、果実発達初期の細胞分裂に関与する。サイトカイニンは、果柄の発達にも関与し、水分や養分、同化産物の果実への輸送にも関与している。オーキシシンも受粉後に増加し、細胞分裂や果柄発達に関係するが、サイトカイニンは、オーキシシンの生合成や輸送に関与している可能性がある (点線)。

摘要

サイトカイニンは、果実形成に重要な働きを持つと考えられているが、その役割と調節についての知見は少ない。本章では、それらを明らかにするために、トマト果実発達時における内生サイトカイニンの定量分析とその代謝に関与する酵素遺伝子群の発現解析を行った。内生のリボシド型サイトカイニンと iP 濃度およびサイトカイニン生合成酵素遺伝子の *SHIPT3*, *SHIPT4*, *SILOG6*, *SILOG8* の発現は、開花当日に高く、その後減少した。一方、iZ 濃度と *SHIPT1*, *SHIPT2*, *SICYP735A1*, *SICYP735A2*, *SILOG2* の発現は、開花後も上昇し、5 日後にピークとなった。サイトカイニンシグナルのマーカである type-A レスポンスレギュレーターをコードする遺伝子群の発現は、開花前から開花後の初期の果実発達期に高かった。これらのことから、内生サイトカイニンは、受粉前の子房発達と受粉後の細胞分裂に関与していることが考えられた。また、合成サイトカイニンである CPPU の未受粉の子房への処理は、果実を肥大させた。CPPU 処理で肥大した果実は、受粉で肥大した果実よりも小さく、これは、細胞数が少ないためではなく、細胞の大きさが小さいためであることが原因であったことから、CPPU 処理による果実肥大は、細胞分裂促進によるためであるためと考えられた。以上の結果から、サイトカイニンは、トマト果実発達初期の細胞分裂促進に関わっていることが示唆された。

第3章 トマト果実形成におけるオーキシンの調節機構

オーキシンは、細胞分裂、細胞肥大、分化、重力応答、頂芽優勢、果実の成長などの様々な成長過程に関与している植物ホルモンである (Woodward and Bartel, 2005)。トマトの果実形成において、オーキシンは重要な役割を持つ物質として考えられており (Gillaspy et al., 1993; Pattison et al., 2014)、2,4-D 等の合成オーキシンを未受粉の子房に処理すると、果実が肥大することが古くから知られている (Nothmann et al., 1983; Abad and Monteiro 1989)。この現象は、現在の果菜類の栽培に非常に重要であり、合成オーキシンの 4-クロロフェノキシ酢酸 (4-CPA) 等は、植物成長調節剤としてトマトやナスの着果促進に広く用いられている。栽培環境不良による着果率の低下は、果実を収穫する作物にとって大きな減収の原因となるため、この技術は生産を安定させる上で必要不可欠である。

外生オーキシン処理の研究と比較すると遅れていたが、果実における内生オーキシンの役割については、遺伝子組換え体を用いた研究により明らかになってきている。Rotino ら (1997) は、細菌のオーキシン生合成酵素遺伝子 (*iaaM*) をナスに発現させることにより子房内の内生 IAA 含量を上昇させると、受粉しなくても果実が肥大することを見出し、トマトでも同様の効果を確認している (Ficcadenti et al., 1999)。また、Wang ら (2005) は、オーキシンスIGNAL伝達系の AUX/IAA タンパク質の一つの IAA9 を遺伝子組換えで抑制したトマトは、単為結果果実を形成することを報告している。オーキシンのシグナル伝達機構はシロイヌナズナ等の植物でよく研究されており、通常、内生オーキシン濃度が低い状態では、AUX/IAA タンパク質が、転写因子である ARF タンパク質の働きを阻害している。しかしながら、内生オーキシン濃度が上昇すると、AUX/IAA タンパク質はユビキチンプロテアソーム系で分解され、ARF の下流の遺伝子が発現し、様々なオーキシン応答反応が起こるようになる。受粉前のトマトでは、IAA9 タンパク質等の働きにより、子房が肥大することが抑制されているが、受粉などによるオーキシン濃度の上昇はこの抑制を解除し、果実肥大を開始させると考えられる (Goetz et al., 2007; Pandolfini et al., 2007)。これらのことから、内生オーキシンは、果実発達のトリガーとして機能していると考えられており、その調節は非常に重要である。

主要な天然オーキシンは、IAA である。オーキシンは、研究の歴史が植物ホルモンの中で最も長い、IAA の生合成および不活性化の経路は長い間解明されておらず、シロイヌナズナでその経路に関わる遺伝子が明らかになったのは比較的最近である。生合成経路は、アミノ酸のトリプトファン (Trp) を経由して合成される経路と経由しない経路が提唱されているが (Normanly et al., 1993)、主要な経路は Trp を経由する経路であると考えられている。さらに、Trp を経由する経路には、インドールピルビン酸 (IPyA)、インドールアセトアミド (IAM)、トリプタミン (TRA)、インドールアセトニトリル (IAN)

を中間体とする 4 つの経路が存在することが提唱されている (図 11)。これらのうち、IAN 経路は、病害防御等に関係する物質であるインドールグルコシノレート代謝と関係しており、それらを生合成するシロイヌナズナなどのアブラナ科植物特有の経路であると考えられている (Sugawara et al., 2009)。IAM 経路は、細菌で見つかった経路であるが、植物でも IAM が検出されること、細菌の IAM の合成に関わっているトリプトファンモノオキシダーゼを植物に過剰発現させると、植物内の IAA が増加することから、この経路が植物にも存在すると考えられている (Rotino et al., 1997; Ficcadenti et al., 1999; Mano and Nemoto, 2012)。また、TRA は、多くの植物で検出されているが、それを經由した IAA 生合成についての詳細は明らかにされていない (Quittenden et al., 2009; Mano and Nemoto, 2012)。現在では、IPyA 経路が主要な IAA 生合成経路であると考えられている (Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Won et al., 2011)。この経路では、Trp が Trp アミノ基転移酵素 (TAA1/TAR) により IPyA に変換され、その後フラビン酸化酵素である YUCCA の触媒反応によって IAA となる。

内生のオーキシンは、生合成だけでなく不活性化や輸送によっても調節されている。最近、IAA の 2 つの主要な不活性化経路が明らかにされた (Mellor et al., 2016; Porco et al., 2016; Zhang et al., 2016)。一つは GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) タンパク質ファミリーによる経路であり、この酵素の反応により、IAA に様々なアミノ酸が結合し、不活性化される (Staswick et al., 2005)。IAA-アミノ酸複合体は、不可逆的に不活性化されるものとアミノ酸が離れて再び活性型の IAA に戻るものがあるが、シロイヌナズナでは、IAA-アスパラギン酸アミドと IAA-グルタミン酸アミドに変換される不可逆的な経路が、不活性化に重要であると考えられている。もう一方は、2-オキシグルタル酸酸化酵素の DIOXYGENASE AUXIN OXIDATION (DAO) によるものであり、IAA のインドール部分の 2 位を酸化し、不可逆的に不活性化する (Zhao et al., 2013)。これらのオーキシンの生合成および不活性化に関わる酵素の遺伝子が発見されて以降、様々な植物における内生オーキシン制御機構の理解が進みつつある。

本章では、オーキシン代謝酵素遺伝子の発現解析や IAA 関連物質の定量分析を行うことにより、トマト果実発達期における内生オーキシン制御機構を明らかにすることを試みた。これらの制御機構を明らかにすることは、植物成長調節剤の有効な利用方法の開発やその内生量を制御した単為結果品種の開発につながることが期待される。

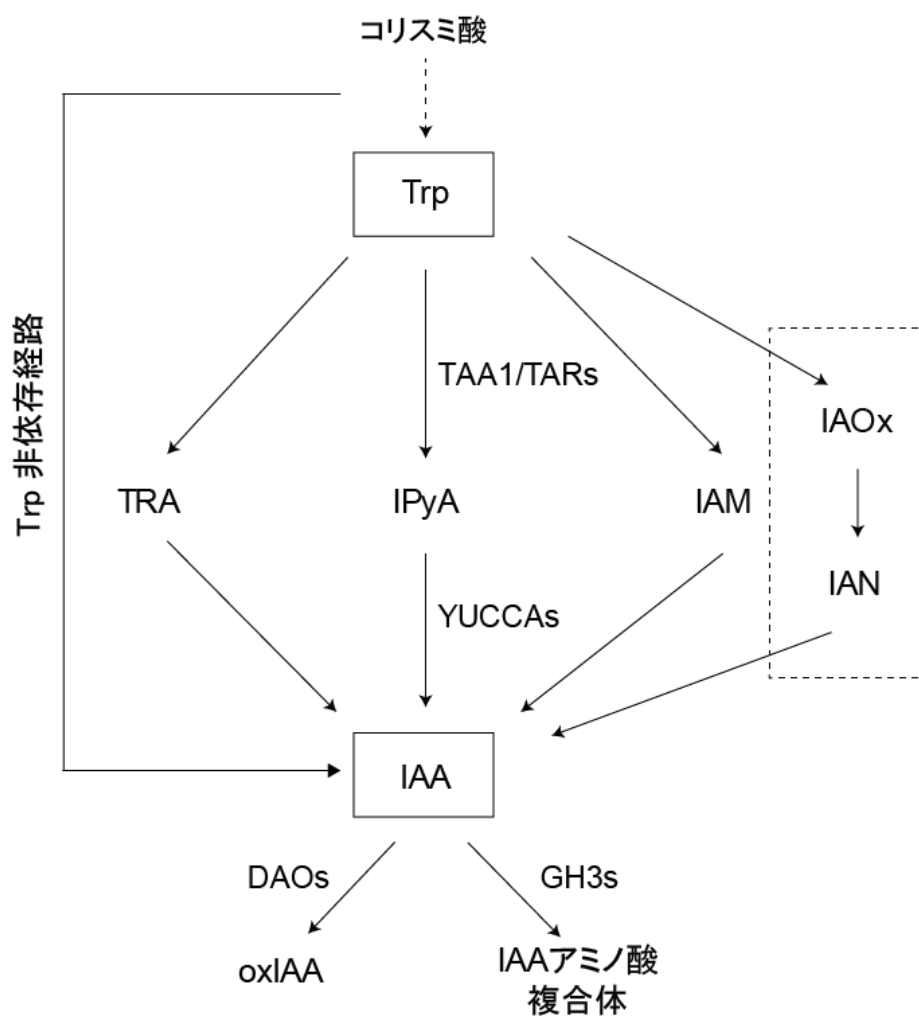


図 11 提唱されている植物のオーキシン生合成および不活性化経路

IAA= インドール酢酸; IAM= インドールアセトアミド; IAN= インドールアセトニトリル; IAOx= インドールアセトアルドキシム; IPyA= インドールピルビン酸; oxIAA= 2 オキシインドール酢酸; TRA= トリプタミン; Trp= トリプトファン。破線で囲った部分は、アブラナ科植物特異的経路を示す。

材料と方法

植物材料

本章の研究では、植物材料として、トマト‘アイルサクレイグ’を用いた。栽培等は第2章と同様の方法で行った。

オーキシシン関連物質の分析

IAA、Trp、TRA および IAM の抽出は、約 50mg の果実を液体窒素下で粉砕し、80% アセトン 3mL を添加して行った。内部標準として、 $[^{13}\text{C}_6]\text{IAA}$ 、 $[^2\text{H}_5]\text{Trp}$ 、 $[^2\text{H}_5]\text{IAM}$ および $[^2\text{H}_4]\text{TRA}$ (OlchemIm) を添加し、4°C で一晩静置した。遠心分離により抽出液を回収し、沈殿に新しい 80% アセトン 3mL を添加して 30 分間抽出し、1 回目の抽出液と合わせた。ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した後、1% 酢酸に溶解し、1% 酢酸で平衡化した Oasis HLB カラム (60 mg; Waters) に添加した。カラムを 5% メタノールで洗浄した後、80% メタノールを添加し、溶出液を回収した。ロータリーエバポレーターで溶出液から溶媒を除去し、1% 酢酸に溶解し、1% 酢酸で平衡化した Oasis MCX カラム (60 mg; Waters) に添加した。続いてカラムを 2% ギ酸で洗浄した後、100% メタノールを添加して IAA および IAM を溶出し、それらを回収した。さらに、カラムに 5mL の 5% アンモニア水を含むメタノールを添加し、Trp と TRA を回収した。ロータリーエバポレーターを用いてそれぞれの画分から溶媒を除去し、Trp と TRA を含む画分は、水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。IAA と IAM を含む画分は、1% 酢酸に溶解し、1% 酢酸で平衡化した Oasis WAX カラム (60 mg; Waters) に添加した。カラムを 1% 酢酸で洗浄した後、100% メタノールを添加して IAM を回収し、続いて 1% 酢酸を含む 80% メタノールを添加して IAA を回収した。ロータリーエバポレーターでそれぞれの画分から溶媒を除去し、残渣を水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。

IPyA は、不安定な化合物であり、抽出や分析時に分解してしまう可能性があり、正確な定量には誘導体化する必要があることから、他の物質とは別に抽出を行った (Novák et al., 2012)。IPyA 分析の内部標準として、Liu ら (2012) の方法で $[^{13}\text{C}_{11}, ^{15}\text{N}_2]\text{Trp}$ から $[^{13}\text{C}_{11}, ^{15}\text{N}_1]\text{IPyA}$ を合成したものをを用いた。抽出は、約 50mg の果実を液体窒素下で粉砕し、氷上で冷却した 1% ジエチルジチオカルバミン酸を含むリン酸ナトリウム緩衝液 (50mM、pH7.0) 3mL を添加し、4°C で 15 分間の振とうすることにより行った。遠心分離後に抽出液を回収し、抽出液 1mL に 6mL の 0.25M システアミン溶液 (pH8.0) を添加し、1 時間室温に放置することにより、IPyA をチアゾリジン化合物 (IPyA-TAZ) に誘導体化した。誘導体化反応後の液を 1M 塩酸で pH2.7 に調整し、リン酸ナトリウム緩衝液 (50mM、pH2.7) で平衡化した Oasis HLB カラム (60 mg; Waters) に添加し、IPyA-

TAZ を吸着させた。カラムを 5%メタノールで洗浄した後、80%メタノールを添加し、IPyA-TAZ 画分を回収した。ロータリーエバポレーターを用いて抽出液から溶媒を除去し、残渣を水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。

LC/MS/MS は、1260 Infinity LC System (Agilent) と質量分析計 6460 Triple Quadrupole LC/MS system (Agilent) より構成されたものを用い、イオン化は、ESI を用いて行った。各化合物の分析の HPLC 条件を表 3 に示す。定量は MRM モードで行い、プロトン付加されたプレカーサーイオン ($[M+H]^+$) と派生するプロダクトイオンを使用した。定量に用いたイオンの m/z を以下に示す。 $[^{13}C_6]IAA$ 182.1 > 136.1、 IAA 176.2 > 130.1、 $[^2H_5]IAM$ 180.1 > 134.2、 IAM 175.2 > 130.1、 $[^{13}C_{11},^{15}N_1]IPyA-TAZ$ 275.1 > 142.3、 $IPyA-TAZ$ 263.0 > 132.0、 $[^2H_4]TRA$ 165.1 > 148.1、 TRA 161.1 > 144.1、 $[^2H_5]Trp$ 210.2 > 150.3、 Trp 205.2 > 146.1。データ解析には、MassHunter ソフトウェア (Agilent) を使用した。

オーキシン代謝酵素遺伝子配列の解析

TAR、YUCCA、GH3 および DAO の配列情報は、第 2 章と同様の方法でシロイヌナズナとイネの遺伝子のアミノ酸配列をもとに NCBI と SOL データベースから取得した。

定量リアルタイム PCR

全 RNA の抽出および定量リアルタイム PCR は、第 2 章と同様の方法で行った。試薬は、*SITAR1*、*SITAR2*、*ToFZY7*、*SIDAOI* および *SIGH3-9* の解析には、ユニバーサルプロープライブラリ (Roche) および LightCycler 480 プローブマスター (Roche) 用い、それら以外の遺伝子には、LightCycler 480 SYBR GREEN I マスター (Roche) を用いた。用いたプライマーの配列等を表 4 に示す。

SITAR2 プロモーターGUS コンストラクトの作製とトマトの形質転換

SITAR2 遺伝子発現の組織特異性を解析するため、トマトゲノム DNA から同遺伝子の翻訳開始点から上流 2863bp の配列を増幅した。増幅には、フォワードプライマー 5'-AAGCTCAAAAGCTTCTCTAAAAGAC-3' と リ バ ース プ ラ イ マ ー 5'-CTGAAGGATCCCTGTGATGTGATTTTGTAC-3'を用い、形質転換用コンストラクト作製のため、これらには、それぞれ *Hind*III と *Bam*HI の切断サイト (下線) を含めた。ベクターpBI121 の *GUS* 遺伝子とノパリン合成酵素のターミネーターを含む配列を *Sma*I と *Eco*RI で切り出し、バイナリベクターpZK3B (Kuroda et al., 2010) の対応する制限酵素サイトに導入した。作製したプラスミドの、*GUS* 遺伝子上流の *Hind*III と *Bam*HI サイトに増幅した *SITAR2* 遺伝子のプロモーター領域を導入した。作製したプラスミドを用いて、Sun ら (2006) の方法により、アイルサクレイグの形質転換を行った。*GUS* 染色は、Nishihara ら (1993) の方法を改変して行った。採取した組織を切断し、20%メタノ

ール、0.15mM フェリシアン化カリウム、0.15mM フェロシアン化カリウム、0.1% Triton X-100、0.5%ジメチルスルホキシド、10mM EDTA を含む 0.1M リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に浸し、37°Cで一晩インキュベートした。70%エタノールで反応を停止し、脱色した後、組織を観察した。

未受粉の子房へのオーキシン処理

人工気象室で栽培したアイルサクレイグの開花 2 日前の花から雄ずいを除去し、開花当日に合成オーキシンの 2,4-D を第 2 章と同様の方法で子房 1 個あたり 20ng 処理した。処理 3 日後に子房をサンプリングし、オーキシン代謝酵素遺伝子群の発現解析に供した。

表 3 第 3 章で分析した各化合物の LC/MS/MS 分析における HPLC の条件

化合物	HPLC カラム	移動相	流速	温度	グラジエント (% B)
IAA	Scherzo SW-C18 (3 μ m, 75 $\times$ 2.0 mm; Imtakt)	A 水/メタノール/酢酸 (89.9/10/0.1, v/v/v) B 100% メタノール	0.2ml/ /分	30°C	0-2 分 0% 8 分 70% 14-22 分 100%
IAM	Scherzo SS-C18 (3 μ m, 75 $\times$ 2.0 mm; Imtakt)	A 水/メタノール/酢酸 (89.9/10/0.1, v/v/v) B 100% メタノール	0.2ml/ 分	30°C	0-1 分 0% 10-12 分 100%
IPyA- TAZ	Cadenza CD-C18 (3 μ m, 150 $\times$ 3.0 mm; Imtakt)	A 水/メタノール/酢酸 (79.95/20/0.05, v/v/v) B 100% メタノール	0.2ml/ 分	30°C	0 分 0% 8-10 分 100%
TRA Trp	Cadenza CD-C18 (3 μ m, 150 $\times$ 3.0 mm)	A 水/メタノール/酢酸 (89.9/10/0.1, v/v/v) B 100% メタノール	0.2ml/ 分	40°C	0 分 0% 6 分 70% 13 分 100%

表 4 第 3 章で実施したリアルタイム PCR に使用したプライマーとプローブ番号

遺伝子	Forward	Reverse	Roche Probe Number
<i>SITAR1</i>	atgccctctgtccatacgat	aaaatggggcagcagataca	21
<i>SITAR2</i>	tgactgattttgtgaggtcgaa	ttccttgatctccattaactacagg	54
<i>ToFZY1</i>	gtactcgacgttgagcattatc	tgaagaaatcacttcccttaaacc	-
<i>ToFZY2</i>	aggaatggaggtgtgttgg	gggacgtgtcaccgagtaa	-
<i>ToFZY4</i>	tcgattctgttcttctgtctact	ctgatagccctcttctgtgaaa	-
<i>ToFZY5</i>	ggcaccgttgaactgtcac	cctttccaattattgggattt	-
<i>ToFZY6</i>	ccagaagaaggaccatttgc	taccattttccaccacaacatc	-
<i>ToFZY7</i>	gaaattgatggattgaaggagttt	cccctgaatttctcaccaga	60
<i>ToFZY8</i>	tgtcatgcatcaatcgctgt	gcagtatacaccatctcccttg	-
<i>SIGH3-2</i>	caatgttgttagcgatggaagag	aatggaccaattgagttacaagca	-
<i>SIGH3-4</i>	aatcggggccactggagataa	tctcgaaattgcataatccataagtt	-
<i>SIGH3-7</i>	acgggtgtgttaattatgtccaatta	ggacatttcgggctaaaataactc	-
<i>SIGH3-9</i>	cccttattcctacaatggggta	acacaccgttgtttcgatga	137
<i>SIGH3-15</i>	agctacgcggacacaaccata	ggttgagccattcacgttgact	-
<i>SIDAO1</i>	cagacttggcattccttactattct	tcaccagacttcttcattacctca	119
<i>SIDAO2</i>	tgggatttcacatctatatatcgtc	ccatctaaaaattcgatgtgtgc	-
<i>SIDAO3</i>	accaccacctgagcttgtg	acaagttagtagcatcataag	-
<i>SLARF8B</i>	tcagggtcatagtgaacaggtagc	tgcggcgacaaatttgggtaattg	-
<i>SLARF9</i>	tgcaaggccatttgcggttac	acgccttgcatttgcaccttg	-
<i>SAND</i>	ttgcttgagggaacagacg	gcaaacagaacccctgaatc	-

結果

果実形成期の IAA 関連物質の動態

トマト果実形成期の内生オーキシシン生合成の制御機構を明らかにするため、IAA およびその前駆物質の Trp、TRA、IAM、IPyA の内生量を測定した (図 12)。内生 IAA 濃度は開花 2 日前の子房でやや高く、開花当日に減少するが、受粉後に増加し、開花 3~5 日後にピークとなり、その後減少した。Trp 濃度は開花 2 日前はやや高いが、開花当日に減少し、開花後 5 から 10 日に増加し、果実成熟期まで高い濃度を示した。IPyA 濃度は開花 2 日前の子房で高く、開花当日にやや低下するが、開花 5 日後まで比較的高く維持された。その後は、急速に濃度が低下し、成熟期まで低く維持された。TRA は発達初期の果実では低濃度だが、開花 10 日後に急激に増加し、その後果実成熟期まで高濃度が維持された。IAM は red-ripe 期に最も濃度が高いが、全体的に他の物質と比較すると低濃度であった。

果実形成期のオーキシシン生合成酵素遺伝子の発現

受粉前後の子房での IAA と IPyA の動態が類似していたことから、IPyA 経路がトマト果実発達初期のオーキシシン生合成の重要な経路であることが示唆された。そこで、IPyA 経路に関わる酵素遺伝子群について果実発達初期の発現解析を行った。IPyA 経路の最初のステップを触媒する TAA1/TAR をコードすると考えられる配列は、トマトゲノムに 5 分子種存在し、本研究では *SITAR1-5* と名付けた (*Solyc03g112460*, *Solyc06g071640*, *Solyc05g031600*, *Solyc01g017610*, *Solyc02g062190*; 図 13A)。これらから推定されるタンパク質のアミノ酸残基数は、365-480 であった。これらのうち、*SITAR5* の配列は、ニンニクのアリナーゼと同じクレードに分類され、他の分子種とは機能が異なる可能性が考えられた (Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008)。果実の発達における *TAR* 遺伝子の発現を解析したところ (図 14)、*SITAR1* の発現は、開花当日の子房で最も高く、受粉後に減少するが、開花 15 日後に再び増加し、その後減少した。一方で、*SITAR2* は、開花 2 日前に比較的高い発現を示すが、開花当日に急減し、受粉により再び急増し、開花 3~5 日後にピークとなり、その後減少した。この遺伝子の発現は、未受粉の子房では低いままであった。他の *TAR* 遺伝子は、果実発達期での発現は低かった。

TAA1/TAR の次の段階の反応を触媒する *YUCCA* については、これまでに、トマトにおいて 6 分子種が報告されており、同じナス科のペチュニアの *YUCCA* 遺伝子である *FLUZZY (FZY)* と配列の相同性が高いことから、*ToFZY1-6* と名付けられていた (Expósito-Rodríguez et al., 2011)。トマトのゲノム情報を検索したところ、これらに加えて 3 つの *YUCCA* 様配列 (*Solyc09g064160*, *Solyc09g091870*, *Solyc09g091720*; 図 13B) を見出し、それぞれ、*ToFZY7-9* と名付けた。これらの発現を解析したところ (図 14)、*ToFZY1* は、

開花 2 日前に比較的高い発現を示すが、開花当日に急減し、受粉により再び急増し、開花 3~5 日後にピークとなり、その後減少した。この遺伝子は、未受粉の子房では発現は低かった。*ToFZY2* と *ToFZY5* は、受粉により発現が急増し、開花 3~5 日後にピークとなり、その後減少した。これらは、未受粉の子房では発現は低いままであった。*ToFZY4* は、開花 25 日後から緩やかに上昇し、turning 期にピークとなった。*ToFZY6* は、開花当日に最も高い発現を示し、受粉後に減少するが、開花 15 日後に増加した。また、未受粉の子房では比較的高い発現が維持された。*ToFZY7* は、開花 2 日前から 1 日後に比較的高い発現を示し、その後急減するが、未受粉の子房では高い発現が維持された。*ToFZY8* は、開花 15 日後から徐々に増加し、開花 30 日後にピークとなり、その後減少した。*ToFZY3* と *ToFZY9* の発現は、低いままであった（データ略）。

SITAR2 の組織特異的発現

受粉後の内生 IAA と IPyA の動態は類似しているが、Trp と IPyA の動態は異なることから、Trp から IPyA への変換、すなわち TAA/TAR が関わる反応が果実形成初期における内生 IAA を制御する重要なステップであると考えられる。この時期に特異的な発現が見られる *SITAR2* の果実以外の器官での発現解析を行ったところ、この遺伝子は根や若い茎、花芽で比較的高い発現が見られたが、受粉 3 日後の子房での発現が最も高かった（図 15A）。果実発達初期のこの遺伝子発現の組織特異性を解析するため、プロモーター部位を単離し、GUS と接続したコンストラクトを作製し、トマトの形質転換を行った。形質転換植物の解析の結果、受粉 3 日後の子房の発達中の種子に強い染色が確認され（図 15B）、受粉 7 日後の子房では染色が弱くなった（図 15C）。

果実形成期のオーキシン不活性化酵素遺伝子の発現

内生の IAA 含量は生合成以外に不活性化によっても調節されており、GH3 と DAO タンパク質が不活性化に関与している。これまでに、オーキシンの恒常性に関与していると考えられているグループIIの *GH3* 遺伝子は、トマトで 6 分子種（*SIGH3-2*、3、4、7、9、15）が報告されていた（Kumar et al., 2012; Liao et al., 2015）。果実の発達過程におけるこれらの遺伝子の発現解析の結果を図 16 に示す。*SIGH3-2* の発現は、開花 15 日後に増加し、breaker 期にピークになり、その後減少した。*SIGH3-4* は、開花後に発現が増加し、開花 25 日後にピークとなり、その後減少した。未受粉の子房では、発現は低かった。*SIGH3-7* は、開花後に発現が増加し、開花 3 日後にピークとなり、その後減少した。未受粉の子房では、発現は低かった。*SIGH3-9* の発現は、開花 2 日前から開花 1 日後にかけて高い発現を示すが、その後急減した。未受粉の子房では、発現が高く維持された。*SIGH3-15* は、開花 1 日後に高い発現を示し、その後急減するが、未受粉の子房では、高い発現が維持された。

トマトの *DAO* 遺伝子は本研究実施時に報告が無かったことから、ゲノムデータベー

スの検索から 3 つの DAO 様の配列を見出し、それぞれ *SIDAO1* (*Solyc02g068310*)、*SIDAO1* (*Solyc02g068320*) および *SIDAO3* (*Solyc02g068330*) と名付けた (図 17A)。これらの推定アミノ酸配列のアミノ酸残基数は、302 (SIDAO1,2) と 257 (SIDAO3) であった。SIDAO3 の推定アミノ酸配列はこのファミリーの共通配列であるジオキシゲナーゼドメインの一部を欠失しており、機能を欠失している可能性がある (図 17B)。これら 3 分子種間の推定アミノ酸配列の相同性は、87.2 から 90.7% であった。*SIDAO* 遺伝子の果実発達における発現を解析したところ (図 16)、*SIDAO1* は、成熟期に特異的に発現していた。*SIDAO2* は、果実発達期全体に発現しているが、初期に比較的高く、成熟期にやや減少した。*SIDAO3* は、開花 10~15 日後に特異的に発現していた。

子房への 2,4-D 処理がオーキシン代謝酵素遺伝子発現に及ぼす影響

オーキシン代謝酵素遺伝子の発現は、内生オーキシンの増減によるフィードバック制御を受けることが知られている。この機構を解析するため、子房への合成オーキシン (2,4-D) 処理に対するオーキシン代謝酵素遺伝子群の発現を解析した (図 18)。オーキシン生合成酵素遺伝子の *SITAR2*、*ToFZY1*、*ToFZY2* および *ToFZY5* の発現は、2,4-D 処理した子房では、未処理のものよりも有意に高かった。一方、*ToFZY6* および *ToFZY7* の発現は、2,4-D 処理した子房では、未処理のものよりも有意に低かった。オーキシン不活性化酵素遺伝子では、*SIGH3-2*、*SIGH3-4* および *SIDAO1-3* の発現は、2,4-D 処理した子房では、未処理のものよりも有意に高かったが、*SIGH3-9* および *SIGH3-15* の発現は、未処理のものにおいて有意に低かった。他の遺伝子は、2,4-D 処理によって発現は変わらなかった。

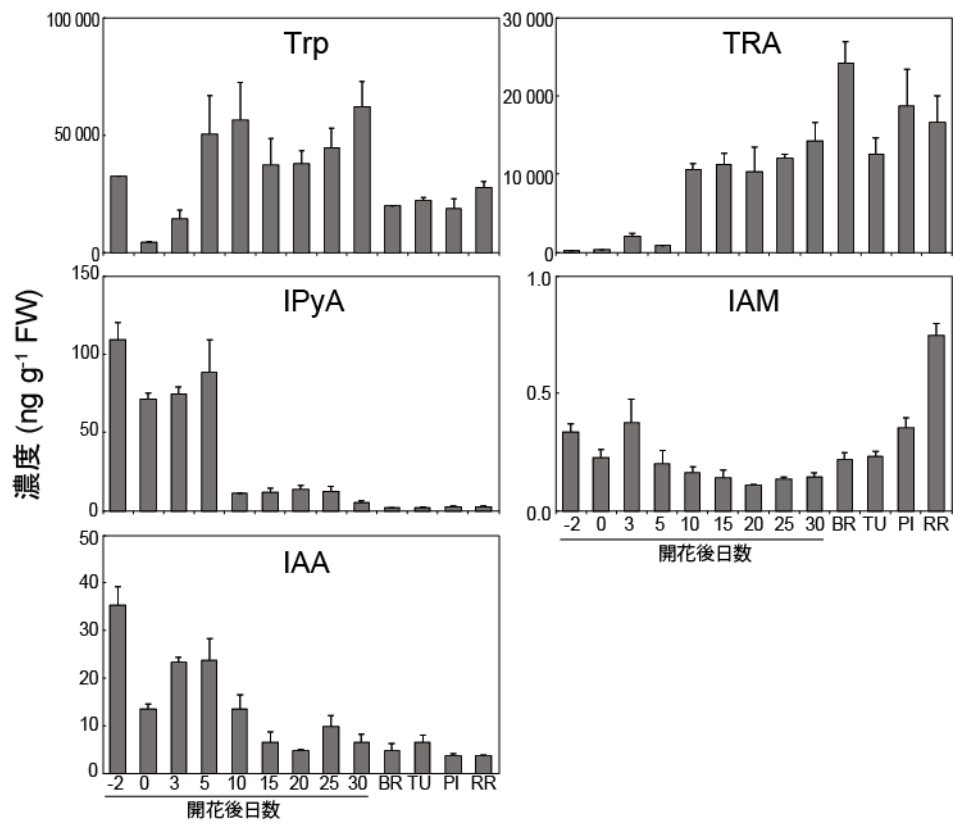


図 12 IAA とその前駆体の果実発達期の動態 (平均値±標準誤差, $n = 3$)

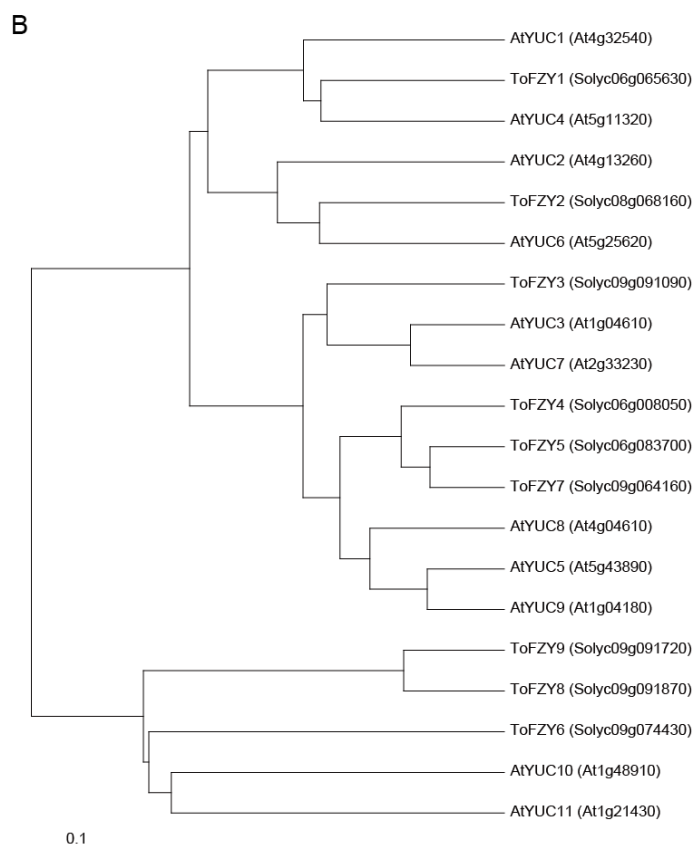
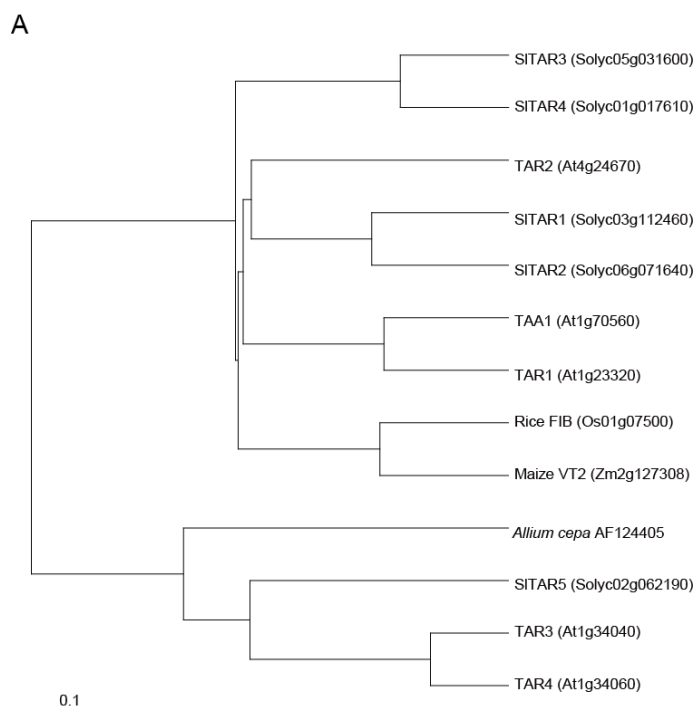


図 13 オーキシシン生合成酵素の系統樹

A, B) TAA1/TAR (A) および YUCCA (B) の推定アミノ酸配列の系統樹。

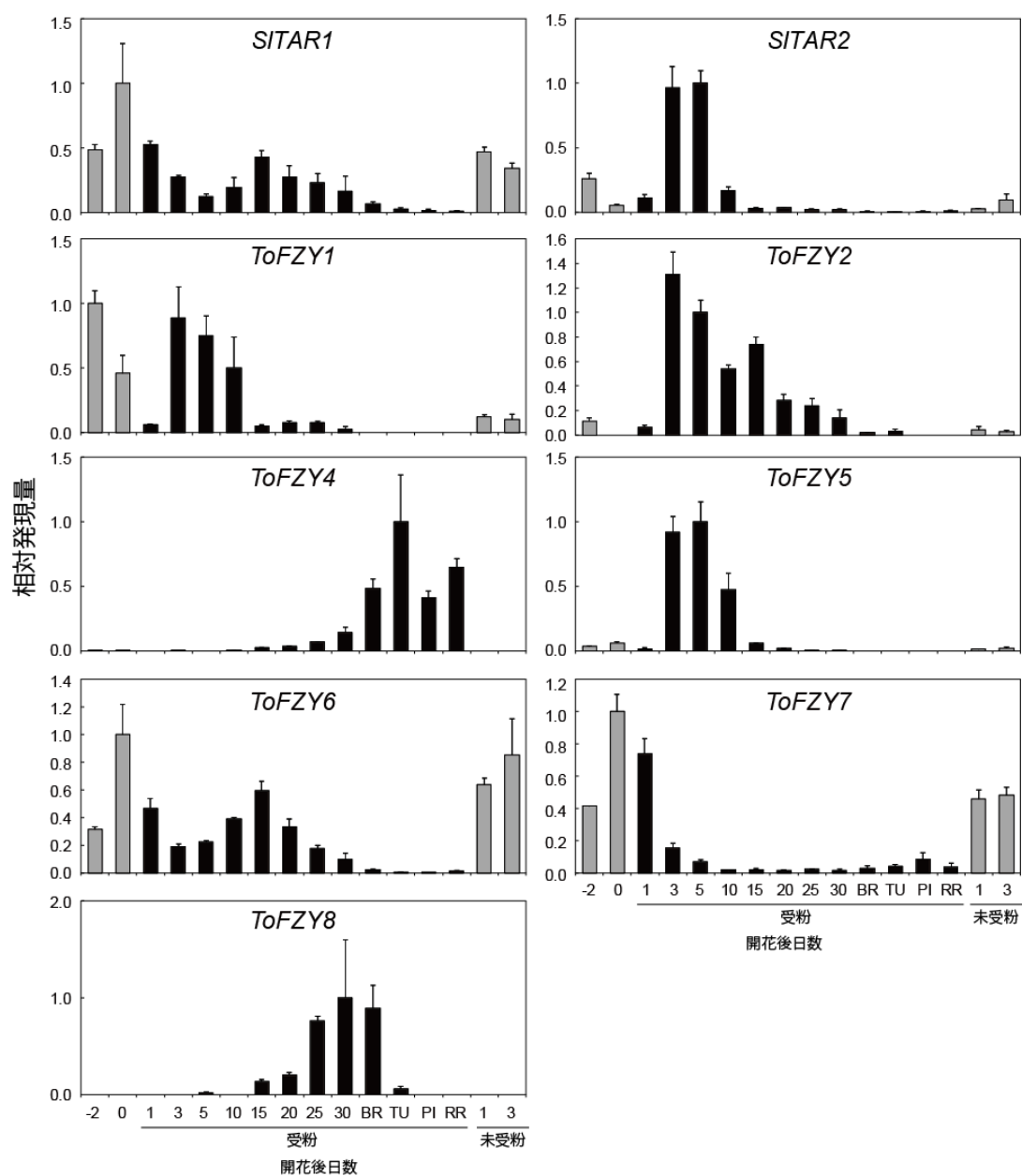


図 14 トマトの果実発達におけるオーキシン生合成酵素遺伝子の発現 (平均 $\pm$ 標準誤差, $n = 3$)

リアルタイム PCR は、授粉（黒）および未受粉（灰色）の子房から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。

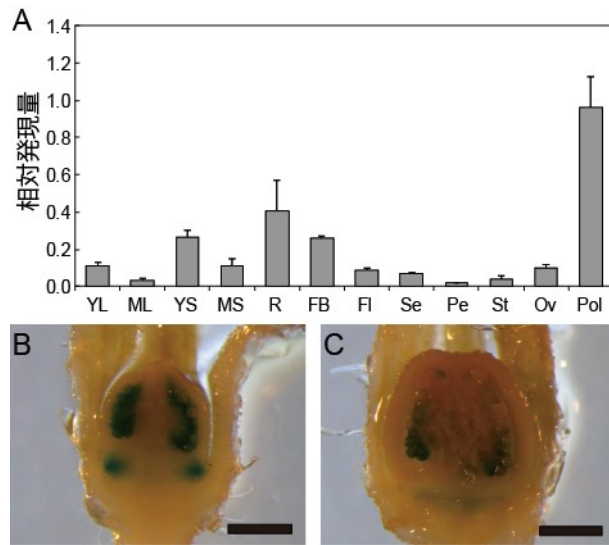


図 15 トマトにおける *SITAR2* 遺伝子の発現

A) トマト各器官における *SITAR2* 遺伝子の発現 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n = 3$)。YL = 未熟葉; ML = 成熟葉; YS = 若い茎; MS = 成熟した茎; R = 根; FB = 花芽; Fl = 花; Se = がく; Pe = 花弁; St = 雄ずい; Ov = 開花当日の子房; Pol = 受粉 3 日後の子房。

B, C) *SITAR2* プロモーター-GUS 組換えトマトの受粉 3 日後 (B)、および 7 日後 (C) の子房の GUS 染色の結果 (スケールバー = 1mm)。

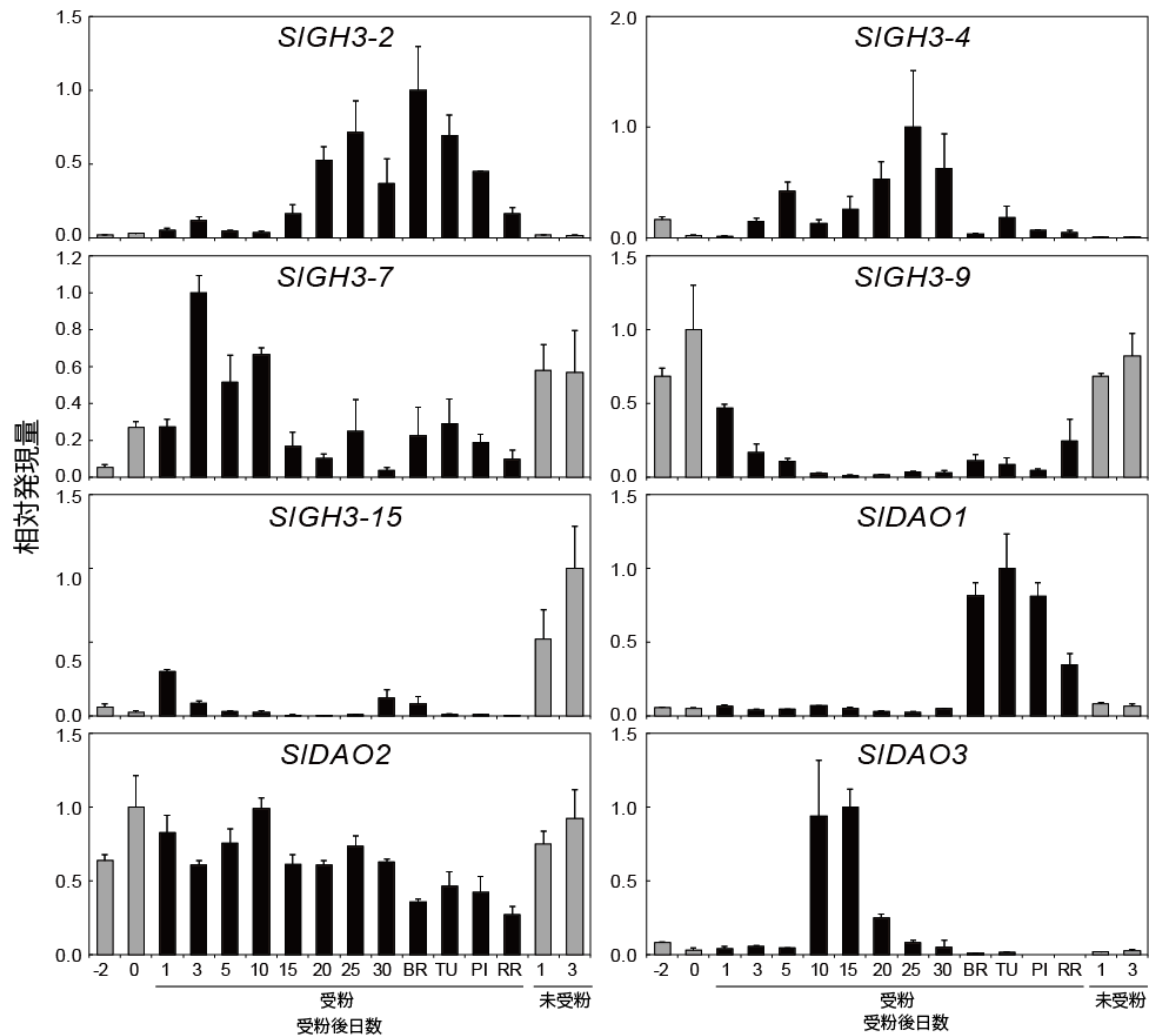


図 16 トマトの果実発達におけるオーキシン不活性化酵素遺伝子の発現 (平均±標準誤差, $n = 3$)

リアルタイム PCR は、受粉 (黒) および未受粉 (灰色) の子房から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。

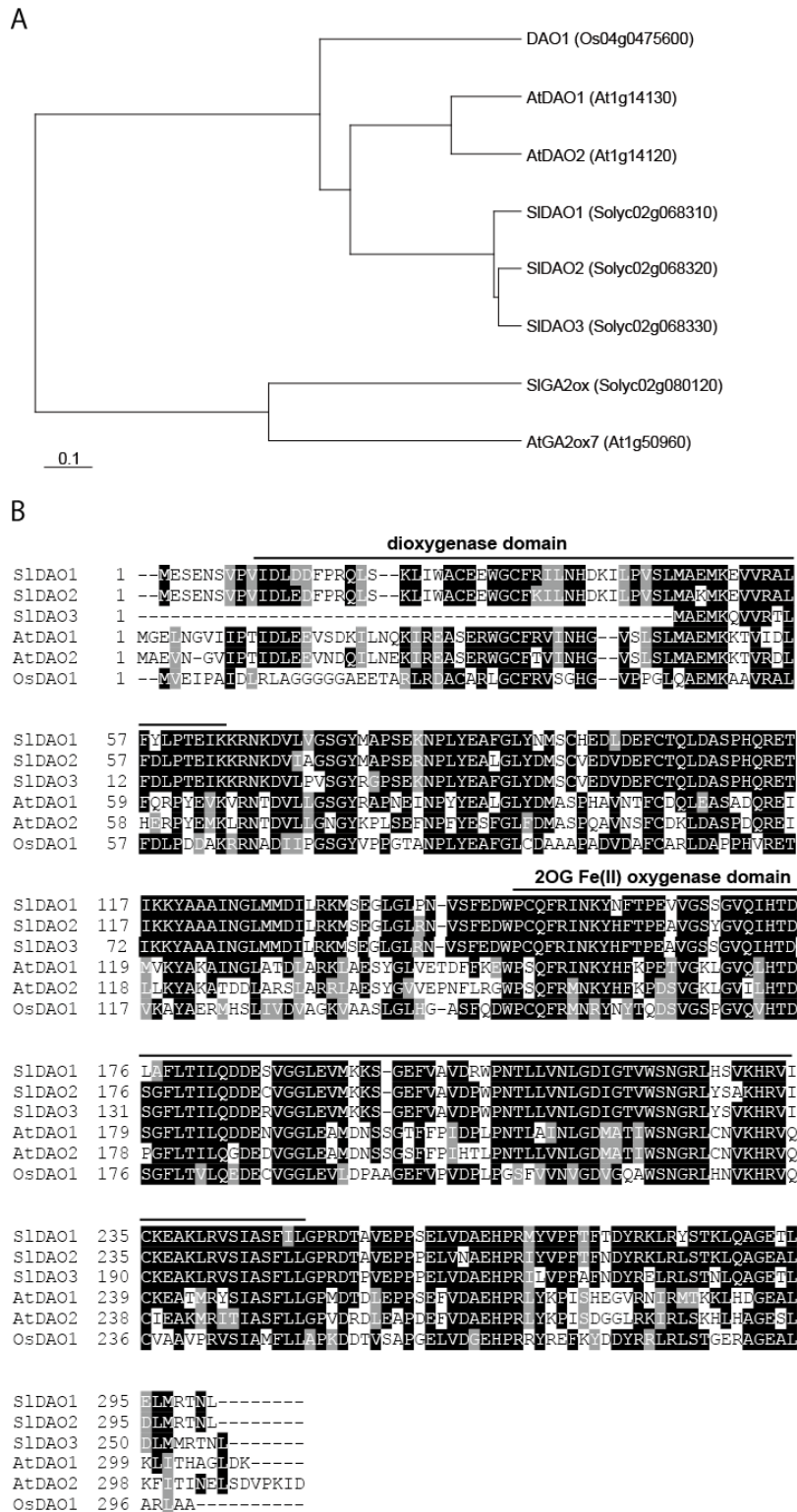


図 17 DAO 遺伝子の推定アミノ酸配列の系統樹 (A) およびアライメント (B)

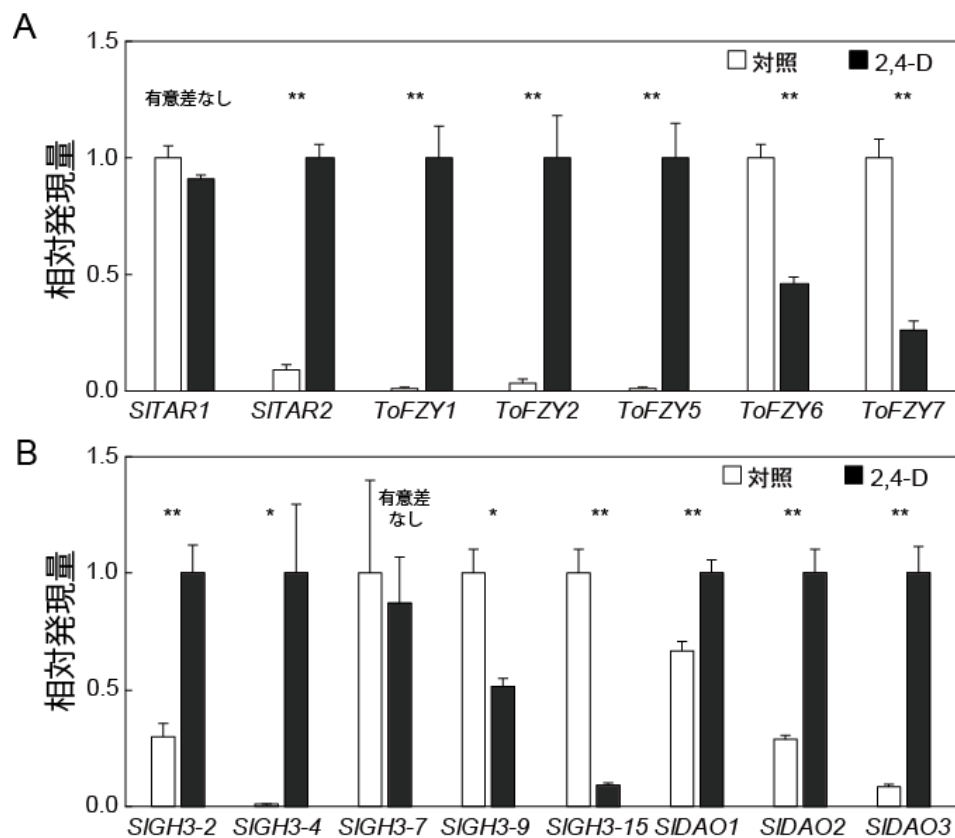


図 18 未受粉の子房への 2,4-D 処理によるオーキシシン生合成酵素 (A) と不活性化酵素 (B) 遺伝子の発現応答 (平均値 $\pm$ 標準誤差, $n = 3$)

リアルタイム PCR は、2,4-D (黒) および溶媒 (白) 処理 3 日後の子房から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。アスタリスクは Student's t test に基づいた有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

考察

本研究では、トマトの果実発達過程におけるオーキシン代謝酵素遺伝子群の発現解析および IAA 関連物質の定量を行った (図 12)。果実発達初期の IAA 含量は開花 2 日前に比較的高く、開花当日に減少するが 3~5 日後に増加し、その後減少した。IAA 前駆物質の動態は物質により異なっていた。Trp は受粉後に増加するが、IAA と異なり開花 10 日目以降も高いレベルが維持された。また、両物質の濃度は大きく異なっており、Trp は IAA の約 1000 倍であった。Trp はタンパク質合成や様々な二次代謝産物の合成に関与していることから、IAA の合成には Trp プールの一部だけが使用されていると考えられる。このため、内生 Trp の調節よりも下流の段階が果実発達期での IAA 生合成に重要であると考えられる。TRA は開花前から当日にかけて低いが開花 10 日後に急増し、さらに、成熟した果実の TRA 濃度は IAA の 100~1000 倍であった。Cooney と Nonhebel (1991) は、同位体を用いた実験からトマトのシュートの内生 IAA と TRA は異なる Trp プールに由来することを示唆している。また、TRA はセロトニンやインドールアルカロイド化合物の前駆体であると考えられており (Mano and Nemoto, 2012)、Ikeda ら (2016) はセロトニンが成熟した果実で増加することを確認している。これらのことから、果実発達における TRA の多くは、セロトニン等の二次代謝産物に変換されている可能性が考えられる。IAM 濃度は完熟した果実に比較的高いが、果実発達期全体における濃度は IAA や他の前駆物質と比較して低いことから、果実形成におけるこの経路の役割は小さいと考えられる。IPyA の内生量は果実発達初期に高く、その動態は IAA と類似しており、濃度も IAA の約 2 から 3 倍と比較的近かった。以上の結果から、果実発達期の IAA の生合成では、IPyA 経路が主要な役割を果たしていると考えられる。

果実発達期の IPyA 経路に関わるオーキシン生合成酵素遺伝子の発現解析を行ったところ、2 つの *TAR* 遺伝子の発現時期は明確に異なっており、*SITAR1* の発現は開花当日と開花 15~30 日後に高いのに対し、*SITAR2* は開花 2 日前と受粉 3~5 日後に高かった (図 14)。また、*YUCCA* 各分子種の遺伝子の発現時期も開花前、開花当日、開花数日後、果実発達後期、成熟期と細かく分かれていた。シロイヌナズナでは *TAA1/TAR* と *YUCCA* の各分子種は時期および部位特異的に発現し、局所的なオーキシンの生合成に関わっていると考えられている (Brumos et al., 2014)。Abu-Zaitoon ら (2012) は、イネの穂の発達期において *TRA* と *YUCCA* 遺伝子は協調して発現し、内生 IAA を調節することを示唆している。また、Kriechbaumer ら (2016) は、いくつかのオーキシン生合成酵素が複合体を構成し、高率的に生化学反応を触媒していることを示唆している。以上のことから、*TAR* と *YUCCA* 各分子種の協調的な働きが果実発達における部位および時期特異的なオーキシン含量の調節に関わっていると考えられる。

SITAR2 と *ToFZY* の 3 分子種 (*ToFZY1*、*ToFZY2* および *ToFZY5*) は開花 3~5 日後に顕著に発現が増加しており、果実発達初期の *IPyA* と *IAA* の動態と一致していた (図 14)。未受粉の子房ではこれらの遺伝子の発現増加は見られないことから、これらが受粉直後の内生 *IAA* の急増に関与しており、増加した *IAA* が果実発達の抑制に関わる *Aux/IAA* タンパク質を分解し、着果と果実肥大が起これと考えられる (Goetz et al., 2006; Pandolfini et al., 2007)。*SITAR2* のプロモーター-GUS 形質転換体の解析の結果は、この遺伝子が発達中の種子で発現していることを示唆しており (図 15B)、受粉後の *IAA* の生合成は発達中の種子で行われていると考えられる。

SITAR1、*ToFZY6* と *ToFZY8* は、開花 15 から 30 日後に高く発現しており、開花 25 日後に *IAA* 含量の増加が確認された (図 14)。Mapelli ら (1978) は、バイオアッセイにより開花 30 日後の果実に高いオーキシン様活性を検出しており、これが果実の最終的な大きさを決定している可能性があることを示唆している。さらに、Pattison と Catalá (2012) は、果実発達後期の種子で高濃度の *IAA* を検出していることから、果実発達後期の種子においてもオーキシン生合成酵素遺伝子が発現し、果実肥大に関与していると考えられる。

オーキシン不活性化酵素遺伝子の発現時期は、生合成酵素遺伝子と同様に細かく分かれていた (図 16)。*GH3* 遺伝子群の発現パターンはいくつかのグループに分けられ、*SIGH3-2* と *SIGH3-4* の発現は果実発達の後期に高いが、*SIGH3-7* は初期に高く、*SIGH3-9* と *SIGH3-15* は未受粉の子房で高かった。さらに、*SIDAO* の各分子種も異なる発現様式を示し、*SIDAO1* は成熟期の果実での発現が高く、*SIDAO2* は果実発達期を通して発現しているが成熟期はやや低く、*SIDAO3* は開花 10~15 日後のみ発現していた。*GH3* と *DAO* は異なる反応を触媒するが、オーキシンを不活性する点で役割が重複している。シロイヌナズナでは、*DAO* は主に通常の生育における内生 *IAA* 調節に関わっており、*GH3* は特定の組織の発達や環境応答での調節に関与していると考えられている (Mellor et al., 2016; Stepanova and Alonso, 2016; Zhang et al., 2017)。本研究の結果から、*SIDAO2* は果実発達期全体を通じた内生オーキシンの調節に関与し、*SIGH3* や他の *SIDAO* は果実発達の特定の時期の調節に関与していると考えられる。興味深いことに、*SIDAO1* は果実成熟期に特異的に発現しており、*SIGH3-2* の成熟期の発現は高く、内生 *IAA* 濃度は果実成熟期を通して低く推移していた (図 12、16)。果実成熟に内生オーキシン量の低下が必要であることは複数の植物で示唆されており (Purgatto et al., 2002; Böttcher et al., 2010; Zaharah et al., 2012)、トマトではこれに 2 つのオーキシン不活性化経路が関与することが明らかとなった。

通常、植物体内の内生オーキシン量の増加や外生オーキシン処理は、オーキシン生合成酵素遺伝子の発現低下と不活性化酵素遺伝子の発現増加を引き起こし、内生オーキシンの過剰な蓄積が抑制される (Kumar et al., 2012; Liao et al., 2015; Suzuki et al., 2015)。2,4-D を未受粉の子房に処理すると、複数の生合成酵素遺伝子 (*ToFZY6* および 7) の発

現低下と不活性化酵素遺伝子 (*SIGH3-2,4* および *SIDAOI-3*) の発現増加が確認されたことから (図 18)、これらの遺伝子はオーキシニンシグナルの上昇によるフィードバック制御を受け、内生オーキシニン量を負に調節していると考えられる。予想外なことに、これらとは逆に 2,4-D 処理により *SIGH3-9* と *SIGH3-15* の発現は低下し、*SITAR2*、*ToFZY1*、*ToFZY2* および *ToFZY5* の発現は上昇した。これは、子房内のオーキシニンシグナルの上昇がオーキシニン生合成の促進と不活性化を抑制する制御も行っていることを示している。また、これらの遺伝子群は受粉で発現が上昇または低下するものと分子種が一致していた (図 14、16、18)。これは、受粉による内生 IAA 量の増加は、特定のオーキシニン代謝酵素遺伝子群の発現を制御することにより、さらなる IAA の蓄積を促進することを示唆しており、子房内に一過的に急激な IAA の増加が起こると考えられる。興味深いことに、トマトの幼植物体では、外生オーキシニン処理は *SIGH3-9* と *SIGH3-15* の発現を上昇させることから (Liao et al., 2015)、他の器官ではこれらの分子種はオーキシニンの過剰な蓄積を抑制するための制御を受けると考えられる。Yamada ら (2009) は、外生オーキシニン処理がシロイヌナズナの生合成酵素遺伝子 *TAA1/TIR2* の発現を地上部では低下させるが、根では上昇させることを確認している。これらのことから、オーキシニン代謝酵素遺伝子は、生育段階や器官の違いによってオーキシニンシグナルに対する応答性が異なると考えられる。

本章の結果から推定されるトマト果実形成初期のオーキシニン制御機構を図 19 に示す。未受粉の子房では、*SIGH3-9* や *SIGH3-15* の発現により、内生 IAA 含量はある一定レベルを超えないように調節されていると考えられる。受粉によりこれらの遺伝子の発現は低下し、IPyA 経路のオーキシニン生合成酵素遺伝子群 (*SITAR2*、*ToFZY1*、*ToFZY2* と *ToFZY5*) の発現が上昇し、IAA の蓄積が促進される。子房内のオーキシニンシグナルの上昇は、さらなるオーキシニン生合成酵素遺伝子の発現誘導および不活性化酵素遺伝子の抑制につながり、急激な内生 IAA の増加をもたらし、細胞分裂が活性化し、果実の成長を促進すると考えられる。

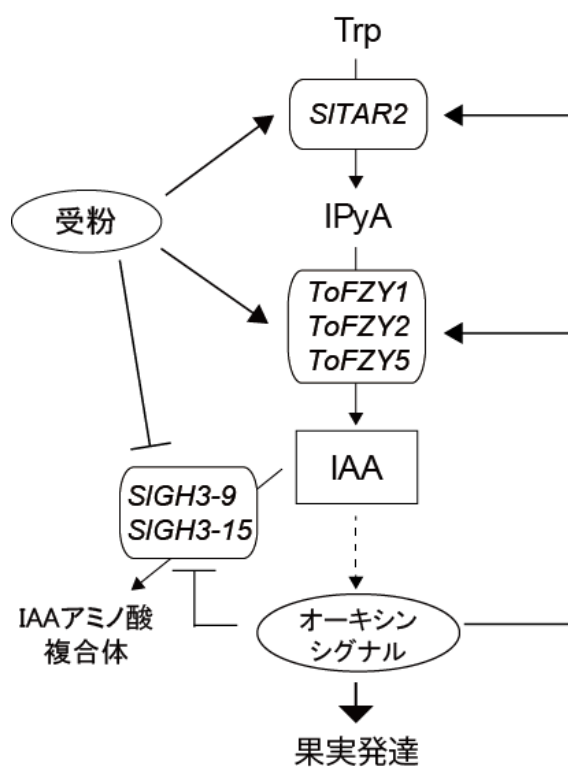


図 19 トマト果実発達初期におけるオーキシシン代謝酵素遺伝子の発現制御のモデル

受粉は、生合成酵素遺伝子（*SITAR2*, *ToFZY1*, *ToFZY2*, *ToFZY5*）の発現を上昇、不活性化酵素遺伝子（*SIGH3-9* と *SIGH3-15*）の発現を抑制し、子房の内生 IAA 濃度が増加する。上昇したオーキシシンシグナルは、同じ代謝酵素遺伝子を制御し、子房内のさらなる IAA の蓄積をもたらし、果実発達を促進する。

摘要

オーキシンは果実形成に重要な役割を持つ植物ホルモンである。本章では、果実発達期における内生オーキシンの制御機構を解析するため、天然オーキシンである IAA とその前駆物質の定量分析、およびそれらの代謝に関わる酵素遺伝子群の発現解析を行った。IAA とその直前の前駆体の IPyA の内生濃度は、開花 3 日後に上昇した。また、オーキシン生合成酵素遺伝子である *SITAR2*, *ToFZY1*, *ToFZY2* および *ToFZY5* の発現は、これらの物質と同様に開花 3 日後に上昇した。これらの結果は、受粉後の子房での IAA の生合成は、IPyA 経路の活性化によるものであることを示唆しており、着果と果実発達初期に関与していることを示唆している。一方、オーキシン不活性化酵素をコードする遺伝子の *SIGH3-9* と *SIGH3-15* の発現量は、未受粉の子房で高く、受粉後に減少したことから、受粉前の子房の内生 IAA 量の調節に関与していると考えられる。さらに、未受粉の子房への合成オーキシンの 2,4-D 処理は、*SITAR2*, *ToFZY1*, *ToFZY2* と *ToFZY5* の発現を上昇させ、*SIGH3-9* と *SIGH3-15* の発現を低下させた。これらの結果は、受粉や外生オーキシン処理で上昇したオーキシンスIGNALは、さらなるオーキシンの蓄積を促進し、受粉後の子房で急激にオーキシンが増加していることを示唆している。

第4章 トマト苗の成長における光質とジベレリン代謝機構

序論で述べたとおり、トマトの苗生産では形態の制御が重要である。苗を栽培するための閉鎖型植物生産システムは、様々な環境条件をコントロールすることが可能であるが、そのうちの光条件は、形態や生育に影響する重要な要素の一つである。システムで用いる人工光源には、これまでメタルハライドランプや蛍光灯が使用されてきたが、最近では、消費電力量が他の光源と比較して小さく、価格も低下しつつある LED が利用されてきている。LED は様々な波長のものが利用でき、それらを組み合わせることで多様な光質環境を作ることができる。

光質と光合成の関係を示す McCree の曲線では、赤色光 (R 光) の領域 (600-700nm) に大きなピークが、青色光 (B 光) 領域 (400-500nm) に小さなピークが見られ (McCree, 1972)、これらの波長の光が光合成にとって重要であり、植物の生育促進に効果的であることを示唆している。また、R 光と B 光は植物の形態形成にとっても重要である。R 光は光受容体であるフィトクロムに、B 光はクリプトクロムやフォトトロピンによって感知され、形態形成に影響する (Lin, 2002)。以上のことから、栽培へ人工光を効率的に利用するには、これらの波長の光を調節することが重要である。これまでに、B 光と R 光がトマトの成長に及ぼす影響についてのいくつかの研究が報告されている (Nanya et al., 2012; Wollaeger and Runkle, 2014, 2015; Hernández et al., 2016)。これらの研究では、B 光下で生育したトマト苗の茎長は R 光下で栽培したものよりも小さくなることが報告されており、これらの光の操作によるトマト苗の形態の制御が可能であることを示唆している。以上のことから、光質がトマトの形態に及ぼすメカニズムを理解することは、閉鎖型植物生産システムにおける光条件の効果的な調節を可能とし、高品質苗生産方法の開発につながる事が期待される。

GA は茎伸長などの形態形成に関与する植物ホルモンである (Olszewski et al., 2002)。農業上では、GA 生合成阻害剤のウニコナゾール等が植物成長調節剤として形態制御に利用されている。一方、GA は脱黄化反応、種子の発芽、避陰反応など、様々な光形態形成にも重要な役割を持つ (García-Martínez and Gil, 2001)。このことから、上記の B 光や R 光照射がトマト苗の茎伸長に及ぼす影響には、内生 GA の作用が関与している可能性が考えられる。

GA は *ent*-ジベレラン骨格を持つ物質の総称である。現在までに 100 種類以上の GA が見つかっており、それぞれに通し番号が付けられているが、その中で植物内生の活性型物質として認識されているものは、GA₁ と GA₄ である (図 20)。GA の前駆物質はゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGDP) であり (Yamaguchi, 2008; Hedden and Thomas, 2012)、プラスチドで *ent*-カウレンに変換される。その後、ミクロゾームに存在する 2 つのシトクロム P450 (カウレン酸化酵素 (CYP701A サブファミリー) とカウレン酸酸化酵素

(CYP88A サブファミリー)) によって GA_{12} に変換される。 GA 生合成阻害剤のユニコナゾールやパクロブトラゾールは、シトクロム P450 の阻害剤である。これ以降の反応は細胞質で行われ、 GA 骨格の 13 位が水酸化される経路（早期 13 位水酸化経路）と水酸化されない経路（13 位非水酸化経路）の 2 つに分けられ、早期 13 位水酸化経路からは GA_1 が、13 位非水酸化経路からは GA_4 が、それぞれ合成される。それぞれの経路では、2-オキシグルタル酸依存の酸化酵素である GA -20 位酸化酵素 (GA -20ox) と GA -3 位酸化酵素 (GA -3ox) が GA_{12} 以降の酸化反応を触媒し、活性型 GA を合成する。 GA の不活性化は、主に 2 位の酸化により行われ、これは同じく 2-オキシグルタル酸依存の酸化酵素である GA -2 位酸化酵素 (GA -2ox) によって触媒される。内生の活性型 GA は、主に GA -20ox、 GA -3ox および GA -2ox をコードする遺伝子の発現制御により調節されると考えられている (Yamaguchi, 2008)。

本研究は、光質の変化と内生 GA 量およびその代謝酵素遺伝子群発現との関係を解析することにより、 B 光と R 光による GA 調節機構を明らかにすることを目的とした。最初に、異なる B 光と R 光の比率 (B/R 比) で生育したトマト苗の内生 GA を定量し、 GA 代謝酵素遺伝子群の発現解析を行った。さらに、 B 光と R 光の強度の変化が、 GA 代謝酵素遺伝子群の発現に及ぼす影響を解析した。

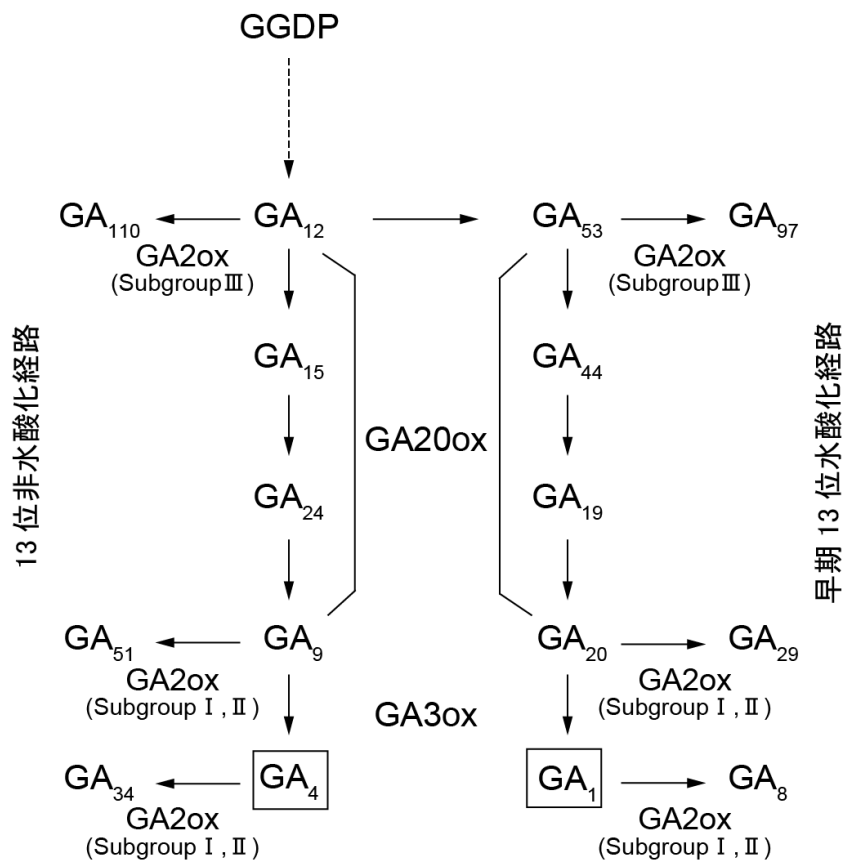


図 20 植物の主要な GA 生合成および不活性化経路

GA20ox = GA 20-oxidase; GA3ox = GA 3-oxidase; GA2ox = GA 2-oxidase; GGDP = ゲラニルゲラニルピロリン酸。四角で囲った GA₁ と GA₄ は活性型の GA を示す。

材料と方法

植物の栽培

本研究では、Nanya ら (2012) の研究で栽培されたトマト‘麗容’を解析に用いた。栽培は千葉大学の閉鎖型植物生産システム内で行われ、概略を以下に示す。栽培環境は、明期は 26°C で 16 時間、暗期は 19°C で 8 時間とした。トマト種子を播種後、暗所で 3 日間、続いて白色蛍光灯下で 7 日間置いた後、各 LED 条件下に移した。B/R 比の影響を解析する試験では、光合成有効光量子束 (PPF: photosynthetic photon flux) を $150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で一定とし、R 光および B 光の LED の比率を変化させた条件とした。B 光および R 光の光強度の影響を解析する試験では、B 光または R 光の光強度を $75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ で一定とし、もう一方の光強度を $25, 50, 75\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に変化させた条件で栽培した。解析には播種 15 日後の植物体の地上部を用いた。

GA および IAA の分析

約 2 g のトマト幼植物体の地上部を液体窒素下で粉碎し、メタノール/水/ギ酸 (15 : 4 : 1, v/v/v) の抽出液 10mL を添加した。内部標準として重水素ラベルされた GA 類 (OlchemIm) と $[\text{C}_6^{13}]$ IAA (Cambridge Isotope Laboratories) を添加し、-20°C で一晩静置した。遠心分離により抽出液を回収し、生じた沈殿に抽出液 10mL を新たに添加して 30 分間抽出し、1 回目の抽出液と合わせた。抽出液を 1M ギ酸で平衡化した Oasis HLB (200mg; Waters) カラムに通過させ、夾雑物を除去した。ロータリーエバポレーターで通過液の溶媒を除去し、残渣を 5mL の 1M ギ酸に懸濁し、1M ギ酸で平衡化した Oasis MCX (150mg; Waters) カラムに添加し、ホルモン類をカラムに吸着させた。Oasis MCX カラムを 5mL の 1M ギ酸で洗浄したのち、100%メタノールを添加して GA 類および IAA を溶出させた。ロータリーエバポレーターで溶出液から溶媒を除去し、残渣を 1% 酢酸に懸濁し、1% 酢酸で平衡化した Oasis WAX (60mg; Waters) カラムに添加し、ホルモン類をカラムに吸着させた。カラムを 100%メタノールで洗浄し 1% 酢酸含有 80%メタノールを添加して GA 類および IAA を溶出した。ロータリーエバポレーターで溶出液から溶媒を除去し、残渣を酢酸エチル/クロロホルム/酢酸 (50:49:1, v/v/v) に溶解し、SepPak シリカ (500mg; Waters) に通過させた。通過液を回収し、さらにカラムに同じ溶媒を添加し、溶出液をあわせた。ロータリーエバポレーターを用いて溶出液から溶媒を除去し、残渣を水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。分析には、第 2 章と同じ LC/MS/MS を使用し、Kotoda ら (2016) と Honda ら (2017) に示す条件で行った。

GA 代謝酵素遺伝子の発現解析

定量リアルタイム PCR は、第 2 章と同様の方法で行った。増幅と検出は LightCycler 480 SYBR GREEN I マスター (Roche) と LightCycler480 (Roche) を用いて行った。反応に用いたプライマーを表 5 に示す。

表 5 第 4 章で実施したリアルタイム PCR にリアルタイム PCR に使用したプライマー

遺伝子	ID	PCR プライマー	
		Forward	Reverse
<i>SIGA20ox1</i>	<i>Solyc03g006880</i>	gagttgatgctaattctcatttct	caactatgtgagatgattctttc
<i>SIGA20ox2</i>	<i>Solyc06g035530</i>	tttccatattctaccctacaag	catcgattacaataactcttgg
<i>SIGA20ox3</i>	<i>Solyc11g072310</i>	aagccaaattatgctagtgttac	tttttatgagatttgtgtcaacc
<i>SIGA20ox4</i>	<i>Solyc01g093980</i>	gatgataaatggcactctattcc	tgacttccttgttcttctacag
<i>SIGA20ox</i>	<i>Solyc06g050110</i>	tggtgaccctaccacaatgcaag	tgactcttgcaggcttcaccaac
<i>SIGA20ox</i>	<i>Solyc09g009110</i>	acttcacatggcctgctctc	acgccttcattgttgaacctc
<i>SIGA20ox</i>	<i>Solyc12g013780</i>	gtggccttcaagtctcaaagatg	tcttccatttgtccaagcctcaag
<i>SIGA3ox1</i>	<i>Solyc06g066820</i>	gcattagtagttaatataggtgac	aagctacagaaagtcgatactgt
<i>SIGA3ox2</i>	<i>Solyc03g119910</i>	gatcataaatttgcattggatac	tgtttccatatgggttaagtaacg
<i>SIGA3ox3</i>	<i>Solyc01g058250</i>	ttaccacgcactgggggttag	cgggagcaattgaagtccatc
<i>SIGA3ox</i>	<i>Solyc00g007180</i>	ggggttagctcctcacacagattcg	tgaggggcatcggttgaaactgg
<i>SIGA3ox</i>	<i>Solyc05g052740</i>	tgcactaggggttagctcctcatac	cgatgagggcatcattggaaattg
<i>SIGA2ox1</i>	<i>Solyc05g053340</i>	gtaagatattagaattgatggcac	ttaatccgtagtagagaatcaga
<i>SIGA2ox2</i>	<i>Solyc07g056670</i>	atattaagatccaataacacttcg	taatcttgatttcacactatttgc
<i>SIGA2ox3</i>	<i>Solyc01g079200</i>	tgacccttctactttcagctc	gaaaattgaattgtcttctatcca
<i>SIGA2ox4</i>	<i>Solyc07g061720</i>	tggaaggaaaagacagtttatac	aacttttctcaaataaggaccaac
<i>SIGA2ox5</i>	<i>Solyc07g061730</i>	gatcacttaccataatacaacag	tataggaacgcatggtttacg
<i>SIGA2ox6</i>	<i>Solyc02g070430</i>	ccaccatgtccagagttgct	gtgggactgagatccatgct
<i>SIGA2ox7</i>	<i>Solyc02g080120</i>	tgcaaatgagaaaggaacaaatg	ccattgtggagcttaggggttg
<i>SIGA2ox8</i>	<i>Solyc10g005360</i>	caaataaggagcggagcaagtc	caaattcttccatggtaaagctg
<i>SIGA2ox9</i>	<i>Solyc04g008670</i>	gatagagtcttggaaatcctcc	catcgaatcacttctctctcg
<i>SIGA2ox10</i>	<i>Solyc06g082030</i>	cgaccatcgccaaacatctct	caatctctacaagcttcaactg
<i>SIGA2ox11</i>	<i>Solyc08g016660</i>	tctcagttccactgatgagcac	cagtacctgcagagaatctccaac

結果

B 光と R 光の比がトマト苗の内生 GA 含量に及ぼす影響

Nanya ら (2012) の研究により、トマト苗を R 光単独の LED (R150) 照射下で栽培すると、他の光質条件と比較して茎長が有意に大きくなることが確認されていた (図 21A)。このメカニズムを明らかにするため、茎伸長の促進に関わる植物ホルモンである GA 類と IAA の定量を行った (図 21B)。その結果、GA 類は 13 位水酸化と 13 位非水酸化の両経路の分子種が検出された。13 位非水酸化経路の活性型の GA₄ 濃度は、R150 区で他の試験区よりも有意に高かった。GA₄ の代謝物の GA₃₄ 濃度は、R150 区で他の条件よりも有意に高く、B75R75 区で最も低かった。GA₄ の前駆体の GA₂₄ および早期 13 位水酸化経路の活性型である GA₁ の濃度は、試験区間で有意差は見られなかった。GA₁ 前駆体の GA₁₉ 濃度は、R150 区で他の条件よりも有意に低かった。これらの GA のうち、GA₄ と GA₃₄ の濃度はトマト苗の茎長と相関を示した (図 21C)。一方、IAA 濃度は各試験区間で有意差はなかった (図省略)。以上の結果から、トマト苗の GA 含量、特に活性型の GA₄ が、異なる光条件における茎長の大きさと関連していると考えられた。

B 光と R 光の比がトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現に及ぼす影響

光質と内生 GA 調節の関係を調べるため、異なる B/R 比で生育したトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現を解析した (図 22、表 6)。トマトの GA 代謝酵素遺伝子は、これまでに 4 分子種の GA20ox、2 分子種の GA3ox、11 分子種の GA2ox が同定されていた (Reberts et al., 1999; Serrani et al., 2008; Chen et al., 2016)。トマトゲノムのデータベースを検索したところ、これら以外に 3 分子種の GA20ox (*Solyc06g050110*、*Solyc09g009110*、*Solyc12g013780*) と 3 分子種の GA3ox (*Solyc01g058250*、*Solyc00g007180*、*Solyc05g052740*) の配列が存在した。これらの GA 代謝酵素遺伝子群のうち、*SIGA3ox3* (*Solyc01g058250*)、*SIGA2ox7* (*Solyc02g080120*)、*SIGA2ox10* (*Solyc02g080120*) および *SIGA2ox3* (*Solyc06g082030*) の発現量が、異なる B/R 比間で有意差を示した。R150 区での *SIGA3ox3* の発現は、他の試験区よりも有意に高かった (図 22 左上)。*SIGA2ox7* の発現は、R150 区と B45R105 区において、B75R75 区と B150 区よりも有意に低かった (図 22 右上)。*SIGA2ox3* の発現は、R150 区において他の試験区よりも有意に低かった (図 22 左下)。*SIGA2ox10* の発現は、B150 区において他の試験区よりも有意に低かった (図 22 右下)。

B 光と R 光の強度がトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現に及ぼす影響

光質と GA 代謝の関係をさらに明らかにするため、B 光および R 光の強度が GA 代謝酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した。Nanya ら (2012) の研究で、トマト苗の茎

長は、B 光の強度が増加すると小さくなるが、R 光の強度には影響されないことが明らかとなっていた。B/R 比の変化で発現に変動が見られた分子種の発現解析を行ったところ、*SIGA2ox7* の発現量は、B 光の強度が増加すると有意に大きくなったが、R 光強度には影響されなかった (図 23A)。また、*SIGA2ox7* の発現量と茎長は負に相関していた (図 23D)。*SIGA3ox3* の発現量は、B75R75 区において B75R25 区や B75R50 区よりも高かったが、B 光強度には影響されなかった (図 23B)。*SIGA2ox10* の発現量は、B75R75 区において B75R25 区や B75R50 区よりも高かったが、B 光の強度には影響されなかった (図 23C)。*SIGA3ox3* および *SIGA2ox10* の発現量と茎長の間に相関はなかった (*SIGA3ox3* $R^2=0.14$, $P=0.47$; *SIGA2ox10* $R^2=0.01$, $P=0.89$)。*SIGA20ox3* の発現は、青色および赤色光量の異なる条件間で有意な差は見られなかった。

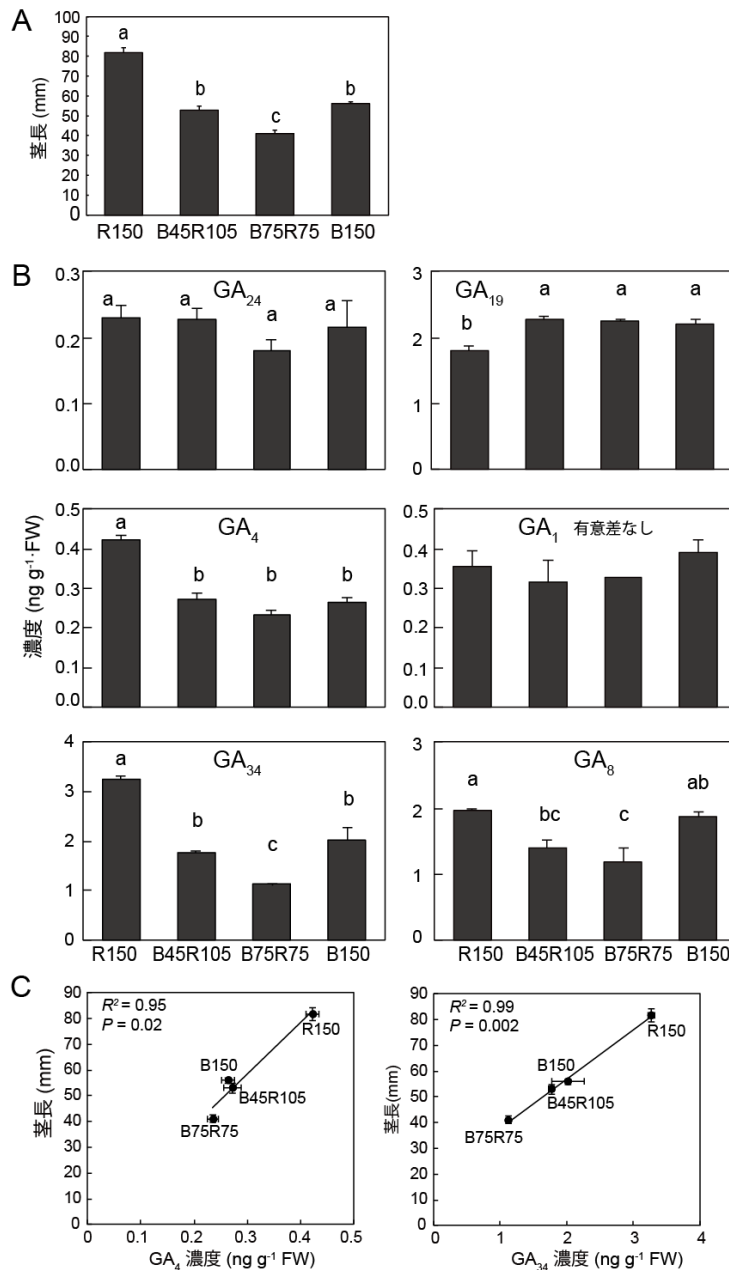


図 21 異なる青色光/赤色光比（B/R 比）の光照射がトマト苗の茎長および内生 GA 濃度に及ぼす影響

- A) 異なる青色光および赤色光の比率で生育したトマト苗の茎長（平均値±標準誤差, $n = 10$ ）。図中の異なる文字は、Turkey-Kramer 法に基づいた有意差を示す ($p < 0.05$)。
- B) 異なる青色光および赤色光の比率で生育したトマト苗の内生 GA 濃度（平均値±標準誤差, $n = 3$ ）。図中の異なる文字は、Turkey-Kramer 法に基づいた有意差を示す ($p < 0.05$)。
- C) 異なる B/R 比で生育したトマト苗の内生 GA 濃度（GA₄ と GA₃₄）と茎長の関係。

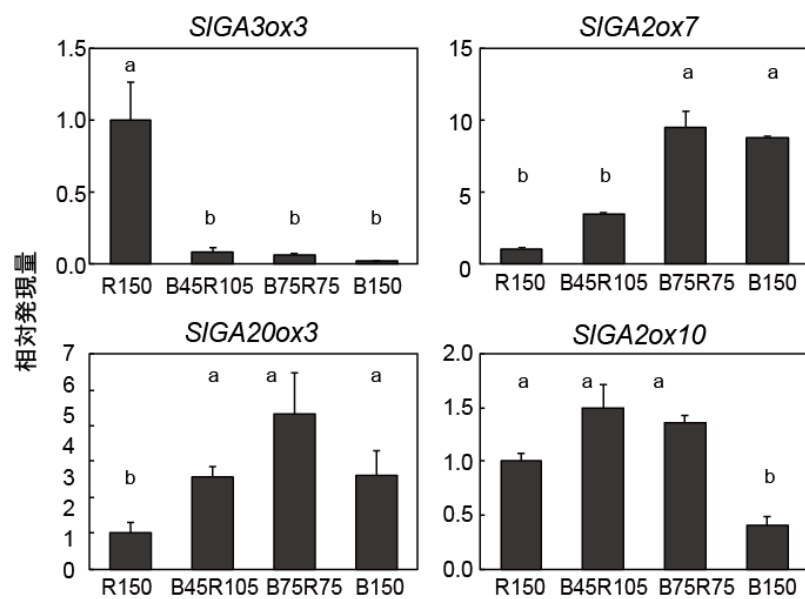


図 22 異なる B/R 比で生育したトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現 (平均値±標準誤差, $n = 3$)

図中の異なる文字は、Turkey-Kramer 法に基づいた有意差を示す ($p < 0.05$)。

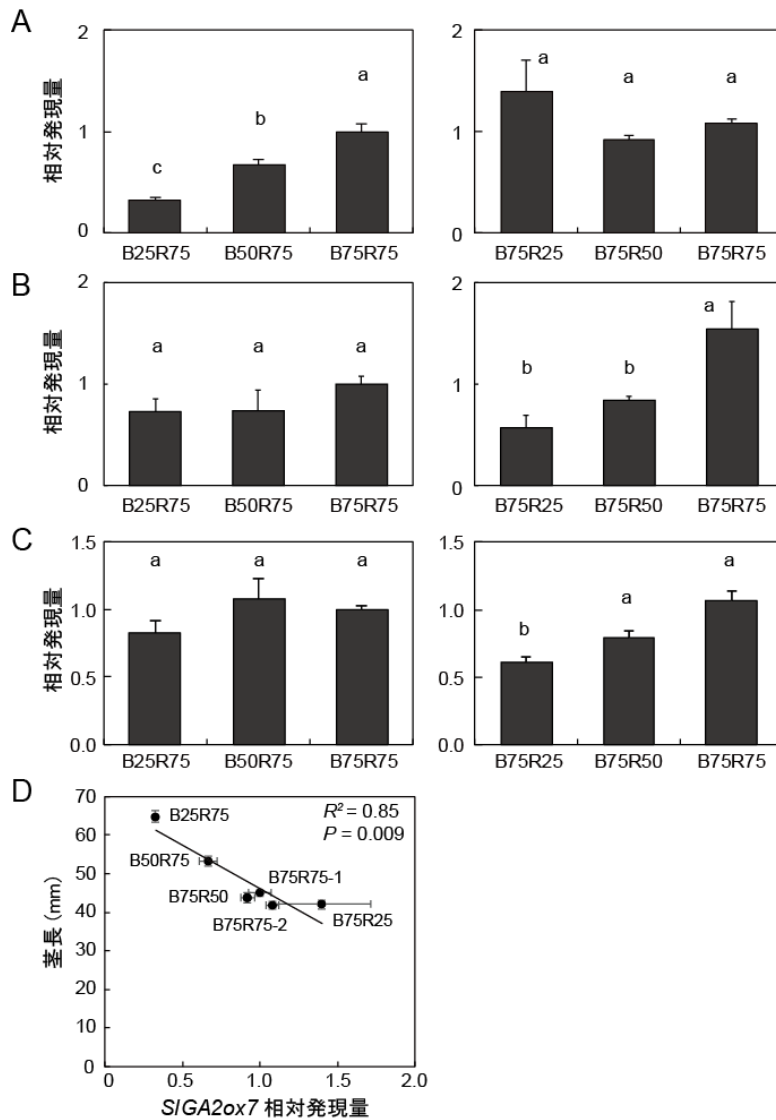


図 23 青色光と赤色光の強度を変化させて生育したトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現

A, B, C) 青色光と赤色光の強度を変化させて生育したトマト苗の *SIGA2ox7* (A)、*SIGA3ox3* (B)、*SIGA2ox10* (C) の発現 (平均±標準誤差, $n=3-4$)。リアルタイム PCR は、青色光と赤色光強度を変化させて生育したトマト苗から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。異なる文字は、Turkey-Kramer 法に基づいた有意差を示す ($p < 0.05$)。

D) 青色光と赤色光強度を変化させて生育したトマト苗の *SIGA2ox7* の相対発現量と茎長の関係。

表 6 異なる B/R 比で生育したトマト苗の GA 代謝酵素遺伝子群の発現（平均値±標準誤差, $n = 3$ ）

遺伝子	相対発現量			
	R150	B45R105	B75R75	B150
<i>SlGA20ox1</i>	1.000 ± 0.058	1.669 ± 0.173	1.883±0.487	0.794±0.140
<i>SlGA20ox2</i>	1.000 ± 0.026	0.707 ± 0.112	0.698±0.043	0.704±0.130
<i>SlGA20ox4</i>	1.000 ± 0.268	0.763 ± 0.163	0.722±0.073	0.671±0.131
<i>Solyc06g050110</i>	1.000 ± 0.295	3.720 ± 2.148	2.225 ± 0.736	1.022 ± 0.676
<i>Solyc09g009110</i>	不検出	不検出	不検出	不検出
<i>Solyc12g013780</i>	不検出	不検出	不検出	不検出
<i>SlGA3ox1</i>	1.000 ± 0.146	1.251 ± 0.297	1.085±0.091	1.295±0.146
<i>SlGA3ox2</i>	1.000 ± 0.179	1.232 ± 0.134	1.496 ± 0.184	0.935±0.089
<i>Solyc00g007180</i>	不検出	不検出	不検出	不検出
<i>Solyc05g052740</i>	不検出	不検出	不検出	不検出
<i>SlGA2ox1</i>	1.000 ± 0.087	0.815±0.127	0.695 ± 0.041	0.611±0.086
<i>SlGA2ox2</i>	1.000 ± 0.139	0.673±0.142	0.803 ± 0.131	0.926±0.140
<i>SlGA2ox3</i>	1.000 ± 0.175	0.387±0.040	0.451 ± 0.042	0.643±0.266
<i>SlGA2ox4</i>	1.000 ± 0.036	0.672 ± 0.086	0.517±0.003	0.830±0.273
<i>SlGA2ox5</i>	1.000 ± 0.438	0.994 ± 0.108	0.970 ± 0.172	1.130 ± 0.346
<i>SlGA2ox6</i>	1.000 ± 0.210	0.685 ± 0.041	0.907 ± 0.353	0.490 ± 0.033
<i>SlGA2ox8</i>	1.000 ± 0.251	1.450 ± 0.238	2.315 ± 0.525	1.478 ± 0.322
<i>SlGA2ox9</i>	1.000 ± 0.640	1.245 ± 0.356	1.413 ± 0.391	0.424 ± 0.075
<i>SlGA2ox11</i>	1.000 ± 0.624	1.335 ± 0.094	1.009 ± 0.152	0.447 ± 0.106

リアルタイム PCR は、異なる B/R 比で生育したトマト苗より抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。

考察

本研究では、光質がトマトの茎伸長に及ぼすメカニズムを明らかにするため、B 光と R 光の比率や強度を変えた条件下で生育した苗の内生 GA 定量とその代謝に関わる酵素遺伝子群の発現解析を行った。異なる B/R 比の条件下で生育したトマト苗の内生 GA 濃度は、分子種によって異なる傾向を示した (図 21B)。13 位非水酸化経路の活性型の GA_4 内生量は、R150 区において他の光条件よりも有意に高かったが、13 位水酸化経路の活性型である GA_1 の内生量には B/R 比変化による影響は無かった。過去の研究では、トマトの幼植物において 13 位非水酸化経路が早期 13 位水酸化経路よりも優位に働いていることが報告されているが (Asahina et al., 2007; Nakaune et al., 2012)、B/R 比変化への応答においても 13 位非水酸化経路が優位に機能することが明らかとなった。内生 GA_4 濃度が茎長と高い相関を示したことは、内生 GA_4 の制御が茎伸長に重要であることを示唆している (図 21C)。また、GA 代謝酵素遺伝子のうちの *SIG42ox7*、*SIG43ox3* および *SIG42ox10* の発現量は B/R 比の違いで変化し、 GA_4 やその代謝物の GA_{34} 濃度と関係する動態を示した。*SIG42ox7* の発現量は、B 光強度の増加により増加するが、R 光強度の増加では変化しないことから (図 23A)、この遺伝子は、B 光強度によって発現が制御されると考えられる。一方、*SIG42ox10* の発現量は R 光強度の増加と共に増加するが、B 光強度の増加では変化しないことから、R 光強度によってコントロールされていると考えられる (図 23C)。また、*SIG43ox3* の発現量は R 光強度の変化による影響が見られたが、 GA_4 含量の大きな増加は、R150 でのみ確認された (図 23B)。よって、GA 生合成酵素の活性は、R 光単独照射下において他の光条件よりも顕著に高くなると考えられる。R150 区では、*SIG42ox3* の発現は、他の光条件よりも低かった。GA 生合成酵素遺伝子は内生 GA によりフィードバック制御されることが知られていることから、R150 区における *SIG42ox3* の低い発現は、高濃度の GA_4 による影響と考えられる。以上のことから、*SIG42ox7*、*SIG42ox10*、*SIG43ox3* の発現が、光質変化による内生 GA の調節に重要であると考えられる。また、これらのうちで、茎長と *SIG42ox7* の発現量は高い相関を示したが (図 23D)、*SIG43ox3* および *SIG42ox10* の発現量との相関は低かったことから、B 光による *SIG42ox7* の発現制御が光質によるトマト苗の草丈調節に最も重要であると考えられる。

B 光が GA 代謝へ及ぼす影響は、植物の脱黄化反応においても報告されている。暗所で発芽した植物に B 光を照射すると、GA 不活性化酵素遺伝子の発現が上昇し、活性型 GA 含量が減少、その影響で胚軸伸長が抑制される (Foo et al., 2006; Zhao et al., 2007; Hirose et al., 2012)。このことから、本研究のトマト苗への B 光照射による茎伸長抑制のメカニズムは、脱黄化反応のものと類似している。一方、最近のシロイヌナズナの研究では、B 光強度は避陰反応にも関係することが報告されている (de Wit et al., 2016;

Pedmale et al., 2016)。植物の避陰反応については、R/FR 比の変化に対する応答がよく研究されてきた。密集した環境で植物が他の植物の陰に入った場合、その環境から逃れるために茎伸長などの様々な生理反応を示すが、これは、自然光のうちの R 光が周囲の植物により吸収され、透過する光の R/FR 比が低くなり、それを R 光受容体のフィトクロムが感知し、植物ホルモンの内生量や応答をコントロールすることによって起こる (Casal, 2012; Kurepin and Pharis, 2014)。しかしながら、通常は R 光だけでなく B 光も植物に吸収されるため、陰では B 光の強度も低下する。植物は、R/FR 比の低下だけでなく、B 光の低下を B 光受容体により感知し、茎伸長を含む様々な反応を誘導することが報告されている (de Wit et al., 2016; Pedmale et al., 2016)。さらに、B 光受容体遺伝子 *CRY1* の機能抑制は、野生型と比較してトマトの茎伸長を促進させることが報告されている (Ninu et al., 1999; Weller et al., 2001)。これらの結果は、トマトの徒長抑制のためには B 光を照射することが不可欠であることを示唆している。B/R 比を変化させた試験では、R150 区での茎長が他の光条件よりも顕著に大きくなるが (Nanya et al., 2012、図 21A)、各試験区の光強度は同じであることから、この茎伸長は R150 区に B 光が含まれていないことが原因であり、それには GA 増加が関係していると考えられる。R150 区における *SIG43ox3* の発現量は B 光が含まれる光条件の 10 倍以上であり (図 22A)、その発現量と茎長の間に相関は無いことから、この遺伝子は B 光が低下した環境下で特異的に発現が増加し、GA 生合成促進を通して茎伸長に影響していると考えられる。

Nanya ら (2012) の研究では、B75R75 区で生育したトマト苗は、B150 区よりも B 光強度が低いにもかかわらず茎長が小さくなった。本研究の結果では、B75R75 区の内生 GA₃₄ 含量は B150 区よりも低く (図 21A)、R75B75 区の *SIG42ox10* の発現は B150 区よりも高かった (図 22 右下)。これらのことから、B75R75 区では、GA 不活性化酵素の活性が B150 区よりも高く、内生 GA が低くなり、茎長が小さくなったと考えられる。この結果は、B 光の強度だけが茎伸長抑制に影響する訳ではないことを示している。シロイヌナズナ等の脱黄化反応では、暗所で発芽した芽生えに R 光を照射すると、GA の不活性化が促進し、胚軸の伸長が抑制される (Foo et al., 2006; Zhao et al., 2007; Hirose et al., 2012)。また、トマトの R 光受容体であるフィトクロム遺伝子の機能抑制は、茎伸長を促進させることが報告されている (van Tuinen et al., 1995; Weller et al., 2000)。これらのことは、B 光と同様に R 光量が不足した場合も茎伸長が促進することを示唆しており、*SIG42ox10* の発現の低下はその応答反応に関与していると考えられる。本研究の栽培条件では、R 光欠乏 (B150) が内生 GA 量の低下や茎長の増加へ及ぼす影響は、B 光欠乏 (R150) によるものよりも小さかった。これは、B 光照射が GA の不活性化を促進するとともに生合成を抑制することが影響していると考えられる。

以上のことから、本章の研究は、B 光が *SIG42ox7* の発現を介した内生 GA 含量調節に重要であり、B 光や R 光強度の不足は内生 GA 量を増加させ、茎伸長に影響するこ

とを示した（図 24）。自然界では、一部の波長の光だけが極端に変化することは起こらないが、特定の波長の人工光を用いた栽培条件下では起こり得ることから、人工光を植物の栽培に利用するには、光質が植物の生育に及ぼすメカニズムを理解することが重要である。今後、光環境の調節によりトマト苗の生産性をさらに向上させるための知見を得るには、トランスクリプトーム解析などを行い、光質が生育に及ぼす様々な影響を網羅的に把握することが重要であると考えられる。

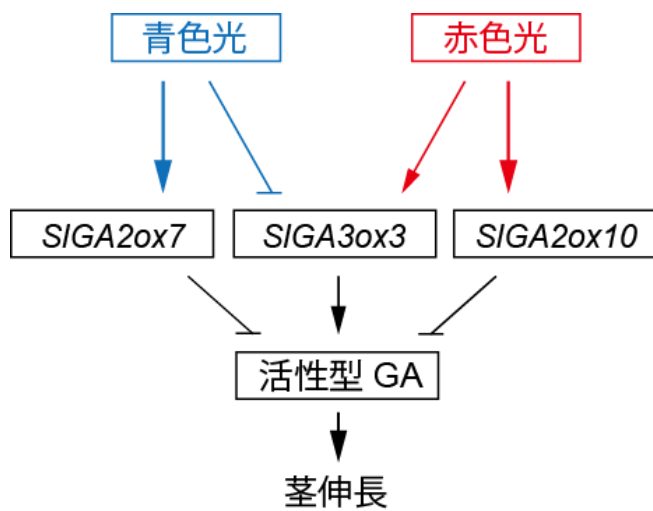


図 24 青色光および赤色光がトマト苗の GA 代謝を制御するモデル

青色光照射は、*SIGA2ox7* の発現促進と *G43ox3* の発現抑制により活性型 GA を低下させ、茎伸長を抑制する。一方、赤色光照射は、*SIGA2ox10* の発現を促進し、活性型 GA を低下させることにより茎伸長を抑制するが、*SIGA3ox3* の発現促進にも関与していると考えられる。

摘要

トマト苗の生産では、徒長抑制等の形態の制御が重要である。光質は、植物の形態形成を制御する重要な環境要因である。以前の研究で、R 光単独の LED で生育したトマト苗の茎長は、B 光単独や B 光と R 光を混合した LED で生育したものよりも有意に大きくなること、また、B 光の強度が茎長を負に制御することが確認されていた。本章では、これらの光質の変化が、トマト苗の茎伸長に及ぼす分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を実施した。B 光と R 光の割合を変化させた条件で生育したトマト苗において、内生 GA 含量とその代謝に関わる酵素遺伝子群の発現を解析したところ、活性型の GA₄ の内生量は、R 光単独条件下では他の光条件よりも有意に高かった。また、R 光に対して B 光の比率を上昇させたところ、GA の不活性化酵素をコードする遺伝子の *SlGA2ox7* の発現が上昇した。さらに、*SlGA2ox7* の発現量は、B 光の強度および苗の茎長と高い相関を示した。これらの結果は、B 光の強度の上昇は、GA の不活性化を促進し、それによる内生の活性型 GA 含量の減少が、茎伸長に影響することを示唆している。また、GA の生合成酵素をコードする遺伝子の *SlGA3ox3* は、R 光単独で生育した苗において、発現量が他の光条件よりも 10 倍以上高かった。この結果は、R 光単独条件下では、B 光が不足しており、苗の過剰な茎伸長には、GA の生合成促進が関与していることを示唆している。

第5章 ナス科果菜類の単為結果性機構

第3章までに示したように、トマトなどの果菜類では、通常、受粉が行われた後に子房内の植物ホルモンの含量が変化し、その作用により細胞分裂や細胞肥大が活性化し、果実が肥大する。しかしながら、この過程のトリガーとなる受粉は様々な環境不良により阻害され、果実が形成されなくなる。これは収量低下の大きな原因となるため、生産者は植物成長調節剤を花に処理し、果実形成を促進させる。しかしながら、これらの作業には大きな労力を要することが問題となる。一方、いくつかの果菜類では、受粉無しでも果実が肥大する単為結果性を示す系統が見つかっており、その形質の利用は果菜類の収量安定につながると考えられている。これまでに、トマトやナスなどでこの形質を持つ系統が確認されており、原因と考えられる遺伝子がマッピングされているものも存在し (Beraldi et al., 2004; Gorguet et al., 2008; Miyatake et al., 2012)、いくつかの系統では子房の内生植物ホルモン類のバランスが野生型の植物と比較して変化していると考えられている (Fos et al., 2000; Olimpieri et al., 2007)。これらの系統は、単為結果品種育成のための素材として有用と考えられているが、果実の肥大が受粉で得られるものと比較して不十分な場合や、受粉しても種子が得られず、育種素材として用いにくいなどの欠点があり、広くは利用されていない (Mazzucato et al., 1998; Gorguet et al., 2005)。単為結果性に関する遺伝子を明らかにし、その機構を理解することは、実用的な単為結果性品種の育成につながることが期待される。本章の研究では、自然突然変異によって得られた新奇単為結果性ナス *pad-1* 変異体を解析し、その機構を明らかにすることを試みた。

材料と方法

植物材料

本研究で用いた *pad-1* 変異を持つナスの系統は、タキイ種苗株式会社の滋賀研究農場において自然突然変異による変異体として発見され、選抜、維持されたものである。ピーマンの *Capad-1* 変異体は、KeyGene 社（オランダ）において、エチルメタンスルホン酸（EMS）処理による変異誘導によって作製され、タキイ種苗株式会社の滋賀研究農場で選抜、維持されたものである。解析に用いた植物の栽培は、農研機構野菜花き研究部門のハウスで行った。

形質転換植物の作製

ナス *Pad-1* 遺伝子の RNAi コンストラクトを作製するため、*Pad-1* cDNA から 522bp の DNA 断片を増幅し、インバーテッドリピート作製用のベクター pTY262（GenBank アクセッション番号: AB736152）の *Xma*I サイトと *Hind*III/*Sac*I サイトにアンチセンスとセンス方向に導入した。ナスのゲノム DNA から増幅した *Pad-1* の 2173bp のプロモーター配列と *Nos* ターミネーターを pUC198AA（Kuroda et al., 2010）に導入し、さらに、先に作製したインバーテッドリピートの配列をプロモーターとターミネーターの間に挿入した。作製したプロモーターからターミネーターまでのカセットをバイナリベクター pZK3B に導入した。得られたプラスミドを用いて、Billings ら（1997）の方法により、ナス‘中手真黒’の形質転換を行った。トマト *SlPad-1* の RNAi コンストラクト作製には、*SlPad-1* cDNA から 523bp の断片を増幅し、pTY262 の *Xma*I サイトと *Hind*III/*Sac*I サイトにアンチセンスとセンス方向に導入した。作製したインバーテッドリピートの配列をカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと *Nos* ターミネーターの間に導入し、作製したプロモーターからターミネーターまでのカセットをバイナリベクター pZK3B に導入した。トマトの形質転換には‘MoneyMaker’を使用し、第 2 章と同様の方法で行った。形質転換のためのコンストラクト作製に用いたプライマーの配列を表 7 に示す。

定量リアルタイム PCR

全 RNA の抽出には、TRIzol（サーモフィッシャー）を用い、ゲノム DNA の除去には、TURBO DNA-free キット（サーモフィッシャー）を用いた。First strand cDNA の合成には、Superscript VILO cDNA 合成キット（サーモフィッシャー）を用いた。定量リアルタイム PCR は、第 2 章と同様の方法で、LightCycler 480 SYBR GREEN I マスター（Roche）を用いて行った。内在性コントロールには、ナスは *rhomboid19-like gene*（Sme2.5_03194.1_g00003.1）を、トマトは *SAND* 遺伝子を使用した。増幅に用いたプライマーの配列を表 7 に示す。

オーキシン関連物質およびアミノ酸の分析

IAA の抽出は、約 0.2 g のサンプルを液体窒素下で粉砕し、0.1%酢酸を含む 80%メタノール 5mL を添加して行った。内部標準として、 $[^{13}\text{C}_6]\text{IAA}$ (OlchemIm) を添加し、4°Cで一晩静置した。遠心分離により抽出液を回収し、沈殿に新しい 0.1%酢酸を含む 80%メタノール 5mL をを添加して 30 分間抽出し、1 回目の抽出液と合わせ、以降の精製は、第 3 章と同様に行った。サンプルを水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。

Trp と IPyA の分析には、内部標準として $[^2\text{H}_5]\text{Trp}$ と第 3 章と同様の方法で作製した $[^{13}\text{C}_{11},^{15}\text{N}_1]\text{IPyA}$ を用いた。抽出は、約 0.2 g のサンプルを液体窒素下で粉砕し、氷上で冷却した 1%ジエチルジチオカルバミン酸を含むリン酸ナトリウム緩衝液 (50mM、pH7.0) 5mL を添加し、4°Cで 15 分間の振とうにより行った。遠心分離後に抽出液を回収し、それを 2 つに分け、4mL を Trp 分析に、1mL を IPyA 分析に用いた。Trp の精製では、抽出液を 1M 塩酸で pH2.7 に調整した後、Oasis HLB カラム (60 mg; Waters) に添加した。カラムを 5%メタノールで洗浄した後、80%メタノールを 6mL 添加して Trp を溶出させた。残渣を 0.1 ギ酸に溶出し、LC/MS/MS 分析に供した。IPyA の誘導体化と精製は第 3 章と同様に行い、サンプルを水/メタノール/酢酸 (80:19.95:0.05, v/v/v) に溶解し、LC/MS/MS 分析に供した。

Trp 以外のアミノ酸の抽出は、約 0.1 g のサンプルを液体窒素下で粉砕し、0.1%ギ酸を含む 80%エタノール 0.9mL を添加して行い、内部標準には、APDS タグワコー用アミノ酸内部標準混合液(富士フイルム和光純薬)を添加した。抽出液を遠心分離し、200 μL の上清を採取し、窒素気流で溶媒を除去した。残渣を 10 μL の蒸留水に溶解し、アミノ酸分析試薬(富士フイルム和光純薬)で APDS (3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメート) 誘導体化した。サンプルを遠心分離し、LC/MS/MS 分析に供した。

使用した LC/MS/MS は、Shimadzu Prominence 20A Series HPLC (島津製作所) 質量分析計 3200 Qtrap (AB Sciex) から構成され、イオン化は、エレクトロスプレー (ESI) で行った。

各化合物の分析の条件は、表 8 および表 9 に示す。定量は MRM モードで行い、プロトン付加されたプレカーサーイオン ($[\text{M}+\text{H}]^+$) と派生するプロダクトイオンを使用した。データ解析には、Analyst version 1.4.2 ソフトウェア (AB Sciex) を使用した。

Pad-1 組み換えタンパク質の機能解析

Pad-1 タンパク質の機能解析のため、*Pad-1c*DNA を pPAL7 ベクター (バイオラッド) に導入し、大腸菌 BL21 (DE3) 株の形質転換を行った。作製した形質転換大腸菌を 37°Cで培養し、IPTG を添加してタンパク質の発現を誘導後、20°Cで 16 時間振とう

培養した。集菌後、B-PER 試薬（サーモフィッシャー）の添加により組換えタンパク質を抽出し、抽出液を eXact ミニスピニングカラム（バイオラッド）を用いて精製した。精製した組換えタンパク質は、Quick Start Bradford Dye Reagent（バイオラッド）を用いて定量した。

アミノ基転移酵素活性測定は、Zheng らの方法に準じて行った（Zheng et al., 2013）。反応は、100 μ L のスケールで行い、アミノ基ドナーとなるアミノ酸 10mM と 1mM IPyA、および 200 μ M ピリドキサルリン酸を含む 50mM のリン酸カリウムバッファー（pH8.5）に 0.5 μ g の組換え Pad-1 タンパク質を添加して行った。反応は 37°C で 1 時間行い、AmiconUltra（10K, 0.5mL; メルクミリポア）による限外濾過によって停止した。内部標準として [2 H $_5$]Trp を限外濾過前に添加し、上述の方法で Trp の精製と定量を行った。

表 7 第 5 章で使したプライマー

遺伝子	用途	方向	配列
<i>Pad-1</i>	プロモーター単離	Forward	tcattgtttcccaaataacga
		Reverse	ctccccgggctagcgagcattccgaaaga
<i>Pad-1</i>	RNAi コンストラクト構築	Forward	ctccccgggaagcttgaggatgttgctcgtaat
		Reverse	ctctcgagctcaacataacctggacaaccgc
<i>SlPad-1</i>	RNAi コンストラクト構築	Forward	ctccccgggatcgatggaggcattgatgcaaaagt
		Reverse	ctctcgagctctcccatcatcccatatgctt
<i>Pad-1</i>	qPCR	Forward	aagagctgttcttaccgatacacc
		Reverse	gattagcaccagcagtaaccatc
<i>Pad-1</i>	組み換えタンパク質発現	Forward	aagctcttcaaagctttaggggtccttggcatgctagc
		Reverse	cgggcttatgcccctattaactggccataccgctattta
<i>rhomboid-like 19</i>	qPCR	Forward	caaccccatctctcactcgt
		Reverse	aacaatgtgacagcccacaa
<i>SmTAR1</i>	qPCR	Forward	aggccagaaaatagtgtgcaga
		Reverse	tttcagcttcagcatttccga
<i>SmYUC1</i>	qPCR	Forward	gtctttgacgtggggactca
		Reverse	acccacacagtagagtcca
<i>SlPad-1</i>	qPCR	Forward	ttgctagaagggtgtgcttac
		Reverse	gcaccatagcgactaactgaag
<i>SAND</i>	qPCR	Forward	ttgcttgagggaacagacg
		Reverse	gcaaacagaaccctgaatc

表 8 第 5 章で分析した各化合物の LC/MS/MS 分析の条件

化合物	HPLC カラム	移動相	流速	温度	グラジエント (% B)
IAA	Cadenza CD-C18 (3 μ m, 150 $\times$ 3.0 mm; Imtakt)	A 水/メタノール/酢酸 (80/19.95/0.05, v/v/v) B 100% メタノール	0.2ml /分	45°C	0-2 分 0% 9 分 60% 19-22 分 100%
Trp	Scherzo SW-C18 (3 μ m, 75 $\times$ 2.0 mm; Imtakt)	A 0.1% ぎ酸 B 100mM ぎ酸アンモニ ウム/メタノール (50/50, v/v)	0.2ml /分	45°C	0 分 10% 8-12 分 100%
IPyA- TAZ	Shim-Pak XR-ODS (3 μ m, 75 $\times$ 2.0 mm; Shimadzu)	A 0.1% 酢酸 B 100mM ぎ酸アンモニ ウム/アセトニトリル (50/50, v/v)	0.2ml /分	40°C	0-7.5 分 0% 7.5-11 分 100%
アミノ酸 APDS 誘 導体	Wakopak Wakosil- II 3C8-100HG (3 μ m, 100 $\times$ 2.0 mm; Wako)	A APDS タグワコー用ホ ウ酸緩衝液 (Wako) B アセトニトリル/水 (60/40, v/v)	0.3ml /分	40°C	0 分 5% 0.01 分 10% 0.5 分 12% 0.51 分 20% 7.75 分 45% 7.76-8.5 分 95%

表 9 第 5 章で分析した各化合物の m/z 値

化合物	極性	m/z
IAA	+	176.2 > 130.1
[¹³ C ₆]IAA	+	182.1 > 136.2
Trp	+	205.2 > 146.1
[² H ₅]Trp	+	210.2 > 192.1
IPyA-TAZ	+	263.1 > 132.0
[¹³ C ₁₁ , ¹⁵ N ₁]IPyA-TAZ	+	275.1 > 142.3
Trp	+	102.1 > 60.1
[² H ₅]Trp	+	106.1 > 56.0
ACC	+	161.1 > 144.1
[² H ₄]ACC	+	165.1 > 148.1
Ala-APDS	+	210.0 > 121.0
[¹³ C ₃]Ala-APDS	+	213.0 > 121.0
Arg-APDS	+	295.1 > 121.0
[¹⁵ N ₄]Arg-APDS	+	299.1 > 121.0
Asn-APDS	+	253.1 > 121.0
[¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂]Asn-APDS	+	259.1 > 121.0
Asp-APDS	+	254.1 > 121.0
[² H ₃]Asp-APDS	+	257.1 > 121.0
Cys-Cys-APDS	+	481.1 > 121.0
[² H ₄]Cys-Cys-APDS	+	485.1 > 121.0
Gln-APDS	+	267.1 > 121.0
[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₂]Gln-APDS	+	274.1 > 121.0
Glu-APDS	+	268.1 > 121.0
[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁]Glu-APDS	+	274.1 > 121.0
Gly-APDS	+	196.0 > 121.0
[¹³ C ₂ , ¹⁵ N ₁]Gly-APDS	+	199.0 > 121.0
His-APDS	+	276.1 > 121.0
[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₃]His-APDS	+	285.1 > 121.0
Ile-APDS	+	252.1 > 121.0
[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₁]Ile-APDS	+	259.1 > 121.0
Leu-APDS	+	252.1 > 121.0
[² H ₃]Leu-APDS	+	255.1 > 121.0

Lys-APDS	+	387.1 > 121.0
[¹³ C ₆ , ¹⁵ N ₂]Lys-APDS	+	395.1 > 121.0
Met-APDS	+	270.1 > 121.0
[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁]Met-APDS	+	276.1 > 121.0
Phe-APDS	+	286.1 > 121.0
[¹³ C ₉ , ¹⁵ N ₁]Phe-APDS	+	296.1 > 121.0
Pro-APDS	+	236.1 > 121.0
[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁]Pro-APDS	+	242.1 > 121.0
Ser-APDS	+	226.0 > 121.0
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N ₁]Ser-APDS	+	230.0 > 121.0
Thr-APDS	+	240.1 > 121.0
[¹³ C ₄]Thr-APDS	+	244.1 > 121.0
Tyr-APDS	+	302.1 > 121.0
[¹³ C ₆]Tyr-APDS	+	308.1 > 121.0
Val-APDS	+	238.1 > 121.0
[¹³ C ₅ , ¹⁵ N ₁] Val-APDS	+	244.1 > 121.0

結果

pad-1 変異体の単為結果性と内生オーキシンの解析

ナスの花の受粉を阻害すると、WT では子房は肥大しないが、*pad-1* 変異体では果実が肥大した（図 25A）。*pad-1* 変異体が形成する単為結果果実は、WT が受粉で肥大する果実よりも重量が大きくなった（図 25B）。また、*pad-1* 変異体を手動で受粉すると種子が形成された（図 25C）。以上のことから、*pad-1* 変異体は、単為結果品種育成のための素材として有用であることが示唆された。

pad-1 変異体の単為結果性の原因を調べるため、内生 IAA の定量を行った（図 25D）。その結果、*pad-1* 変異体の未受粉の子房の内生 IAA 濃度は、WT の約 6 倍であった。また、子房と同様に、*pad-1* 変異体の葯と根の内生 IAA 濃度は、WT よりも有意に高いが、他の地上部の栄養器官は WT と同等であった（図 25E, F）。以上の結果から、*pad-1* 変異体の子房に高濃度の IAA が含まれることが単為結果性の原因であることが示唆された。

pad-1 遺伝子の単離

pad-1 変異体の単為結果性の遺伝子レベルの原因を調べるため、マップベースクローニングによる原因候補遺伝子の単離を行った。その結果、*pad-1* 変異体ではシロイヌナズナの *VASI* と相同性の高いアミノ基転移酵素をコードする遺伝子 (*Pad-1* と名付けた) に欠失などの変異が入っていることが明らかとなり、単為結果性の候補遺伝子と考えられた（図 26）。この変異が単為結果性の原因かを確認するため、この遺伝子の発現を抑制させるための RNAi コンストラクトを作製し、野生型ナス‘中手真黒’の形質転換を行った（図 27A）。形質転換ナスの花の受粉を阻害して単為結果性を確認したところ、形質転換体の果実は肥大したが、WT の子房は肥大しなかった。また、未受粉の子房の内生 IAA 濃度を測定したところ、形質転換体では WT よりも有意に高かった（図 27B）。以上の結果から、*Pad-1* 遺伝子の変異が単為結果性の原因であることが明らかとなった。

Pad-1 遺伝子の発現

野生型ナス‘中手真黒’での *Pad-1* 遺伝子の発現解析を行ったところ、開花当日の花弁、若い葯および根で比較的高い発現が見られた（図 28A）。子房発達における *Pad-1* の転写物量は、未熟なステージでは低い、発達と共に徐々に増加し、開花当日にピークとなり、その後減少した。同じ子房の他のオーキシン代謝に関する遺伝子の発現解析を行ったところ、生合成遺伝子の *SmTAR1* と *SmYUC1* の発現は、*Pad-1* と同様に開花当日に高くなった（図 28B）。子房発達期の内生 IAA を定量したところ、WT では未熟な子房で比較的高い濃度を示したが、徐々に低下し、開花当日まで低く推移したが、*pad-1* 変

異体では開花当日に増加した（図 28C）。

組換え Pad-1 タンパク質の機能解析

IAA 代謝経路と *Pad-1* の関係を解析するため、子房の内生 IAA 前駆体の定量を行った（図 29B）。その結果、Trp 濃度は WT と *pad-1* 変異体の間に有意差は見られなかったが、IPyA の濃度は *pad-1* 変異体において WT よりも有意に高かった。この結果は、*Pad-1* 遺伝子の変異が IPyA 経路に影響することを示唆している。

Pad-1 と推定アミノ酸配列の相同性が高いシロイヌナズナの VAS1 タンパク質は、*in vitro* で IPyA を Trp に変換する反応を触媒することが報告されている（Zheng et al., 2013, 図 29A）。*Pad-1* タンパク質が VAS1 タンパク質と同じ反応を触媒するかを確認するため、大腸菌に発現させた組換え *Pad-1* タンパク質にアミノ基供与体としての Trp 以外の主要アミノ酸、およびアミノ基受容体としての IPyA を添加してアミノ基転移酵素活性を測定した。その結果、組換え *Pad-1* タンパク質は、L-アルギニン、L-グルタミン、L-ヒスチジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-セリンおよび L-チロシンをアミノ基供与体として IPyA を Trp に変換した（図 29C, D）。一方、*pad-1* 変異がナス子房の内生アミノ酸含量に影響するか確認するため、Trp 以外の 19 種類の内生アミノ酸濃度を測定したところ、WT と *pad-1* 変異体との間に明確な差は見られなかった（表 10）。

Pad-1 オルソログ遺伝子の抑制によるトマトとピーマンへの単為結果性の導入

Pad-1 の機能抑制が、他のナス科果菜類への単為結果性導入が可能かの解析を行った。トマトからこの遺伝子のオルソログ（*SlPad-1*）を単離し、*SlPad-1* の RNAi コンストラクトを作製し、非単為結果品種 ‘MoneyMaker’ の形質転換を行った。単為結果性を確認したところ、形質転換体の果実は肥大したが、WT は肥大しなかった（図 30A）。これらの花芽の内生 IAA 濃度を測定したところ、形質転換体では WT よりも有意に高かった（図 30B）。

Pad-1 遺伝子の変異がピーマンの果実形成及ぼす影響を確認するため、オルソログ遺伝子（*CaPad-1*）に EMS で変異を導入した変異体を解析した。単為結果性を確認したところ、WT では子房は肥大せずに全て落果したが、変異体では果実が肥大した（図 30C）。未受粉の子房の内生 IAA 濃度を測定したところ、*Capad-1* 変異体では WT よりも有意に高かった（図 30D）。以上の結果から、*Pad-1* 遺伝子の抑制は、同じメカニズムで 3 種類のナス科果菜類に単為結果性をもたらすことが明らかとなった。

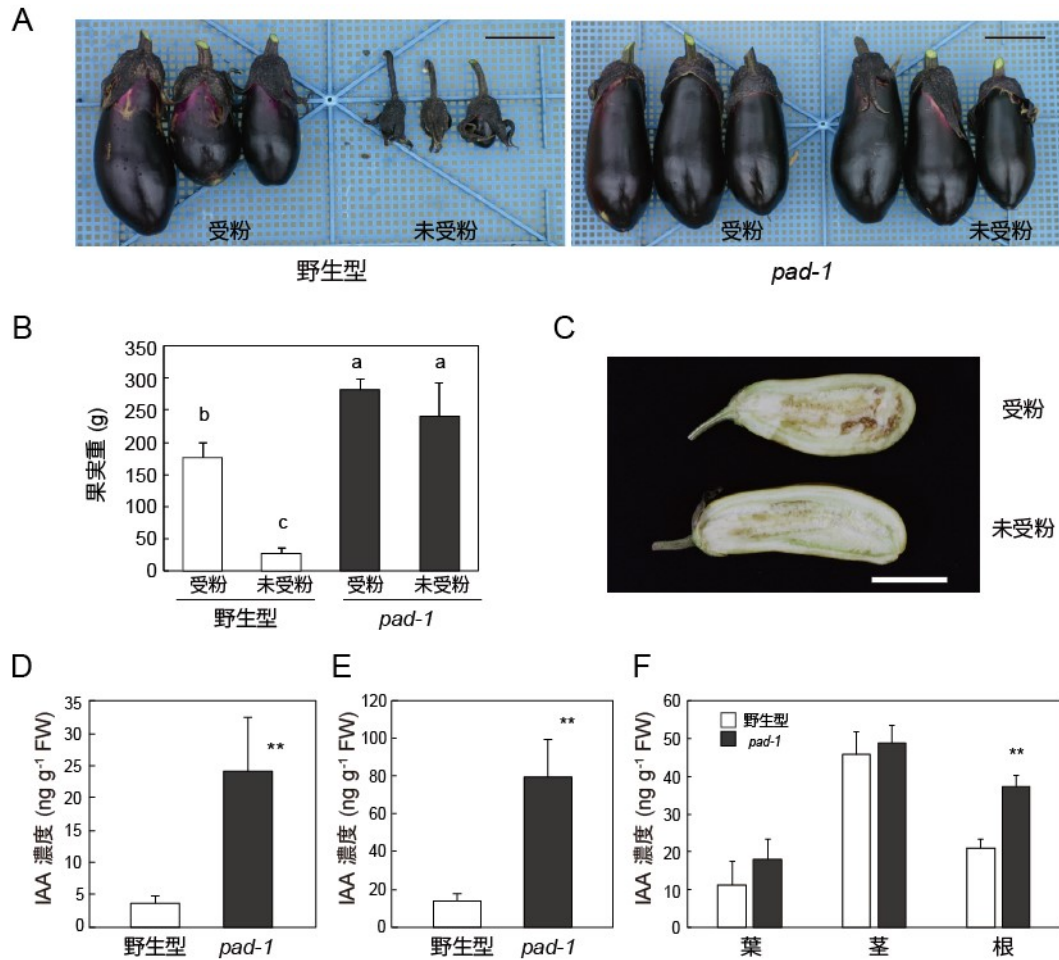
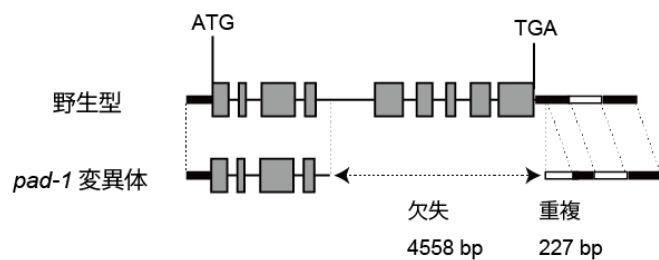


図 25 単為結果性を示すナス *pad-1* 変異体

- A) 野生型 (左) と *pad-1* 変異体 (右) の果実 (スケールバー = 5cm)
- B) 野生型と *pad-1* 変異体の果実重 (平均値±標準偏差, $n=6$)。異なる文字は、Turkey-Kramer 法に基づいた有意差を示す ($p < 0.05$)。
- C) *pad-1* 変異体の受粉果実 (上) と単為結果果実 (下) の切断面 (スケールバー = 3cm)
- D) 野生型と *pad-1* 変異体の開花当日の子房の内生 IAA 濃度 (平均値±標準偏差, $n=4$)。
- E) 野生型と *pad-1* 変異体の葯の内生 IAA 濃度 (平均値±標準偏差, $n=4$)。
- F) 野生型と *pad-1* 変異体の幼植物体各器官の内生 IAA 濃度 (平均値±標準偏差, $n=4$)。
- アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (** $p < 0.01$)。

A



B

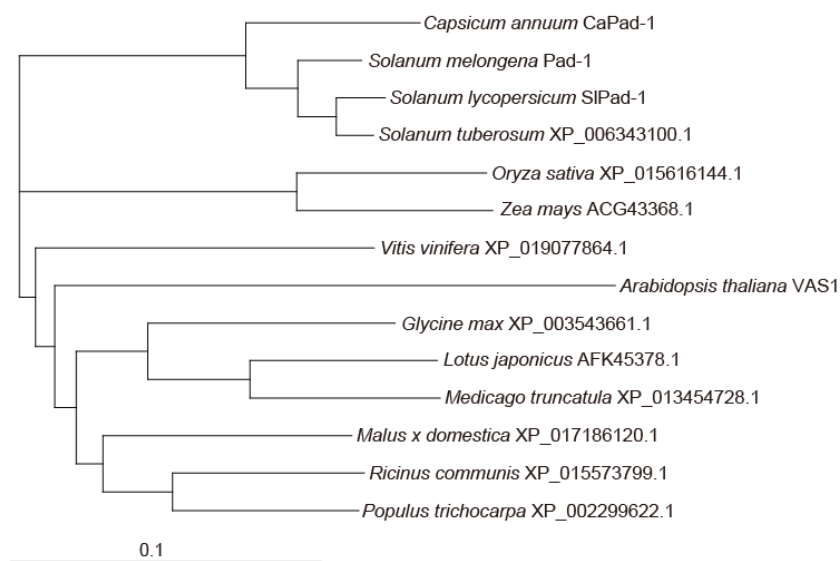


図 26 単為結果原因遺伝子 *pad-1*

A) 野生型（上）と変異型（下）の *Pad-1* 遺伝子の構造。

B) *Pad-1* タンパク質の推定アミノ酸配列の系統樹。

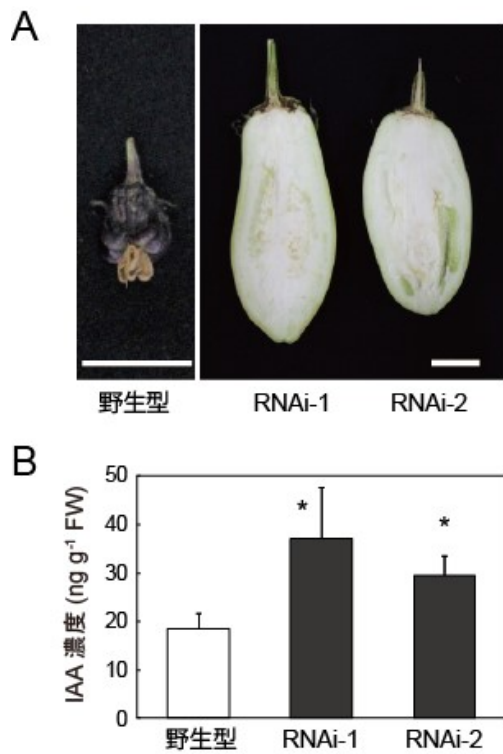


図 27 *Pad-1* 遺伝子の RNAi による抑制

A) 野生型 (左) と *Pad-1* RNAi 形質転換ナス (RNAi-1, RNAi-2) の単為結果果実 (スケールバー = 3cm)

B) 野生型 (白) と *Pad-1* RNAi 形質転換ナス (黒) の開花当日の子房の内生 IAA 濃度 (平均値±標準偏差, $n = 3$)。アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (* $p < 0.05$)。

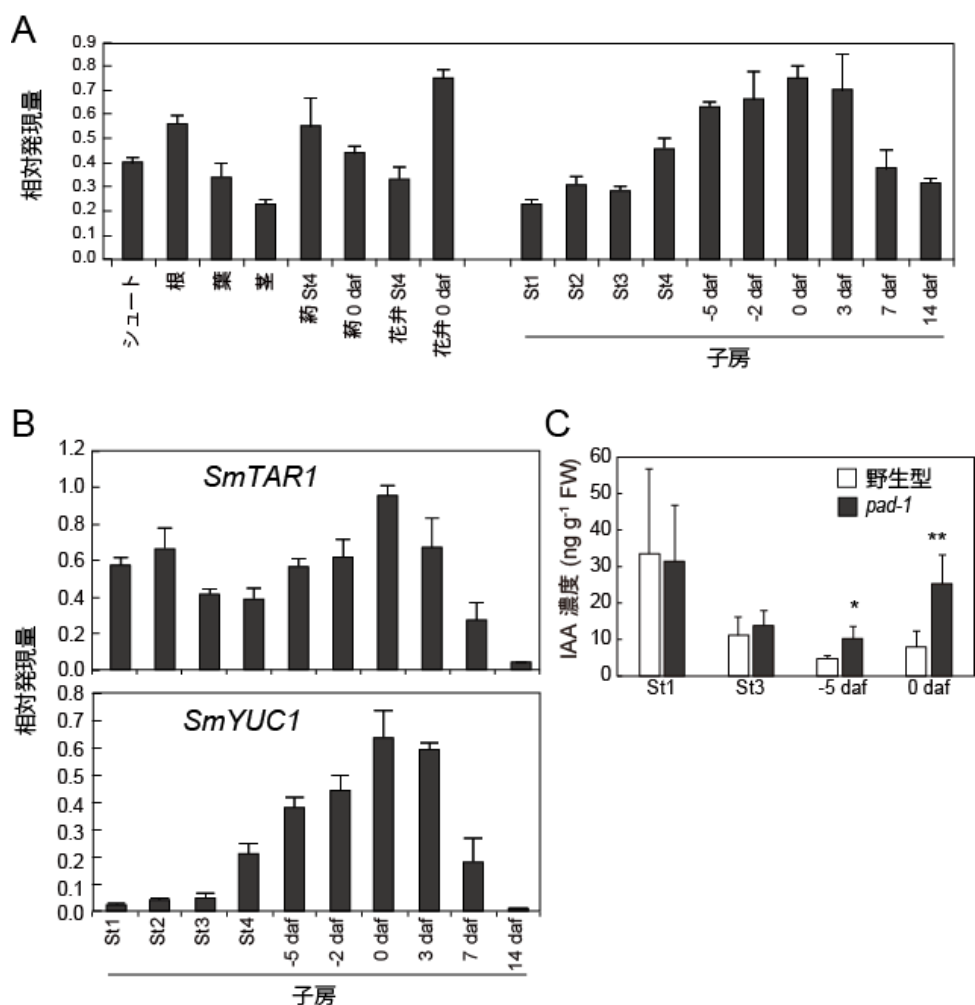


図 28 *Pad-1* とオーキシン生合成酵素遺伝子の発現

- A) 野生型ナスの各器官と子房発達期での *Pad-1* 遺伝子の発現。
 B) 野生型ナスの子房発達期のオーキシン生合成酵素遺伝子 (*SmTAR1*, *SmYUC1*) の発現。
 C) 野生型と *pad-1* 変異体の子房発達期の内生 IAA 濃度 (平均値±標準偏差, $n = 3$)。

リアルタイム PCR は、各器官から抽出した RNA から合成した cDNA を用いて行った。サンプルは、子房が 4mm (ステージ (St) 1)、8mm (St2)、10mm (St3)、14mm (St4) および開花 5 日前 (-5 daf)、2 日前 (-2 daf)、開花当日 (0 daf)、3 日後 (3 daf)、7 日後 (7 daf) 、14 日後 (14 daf) のステージから採取したものをを用いた。アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

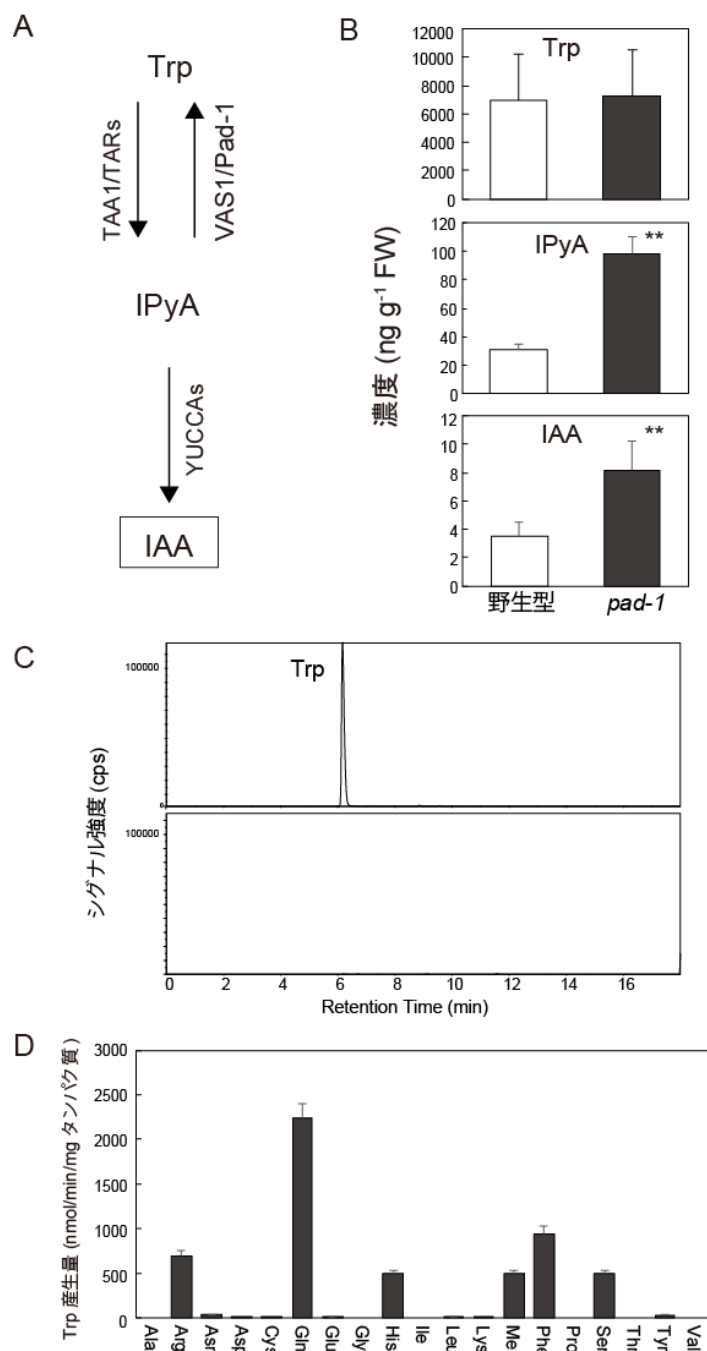


図 29 Pad-1 タンパク質の機能解析

A) IPyA を経由する IAA 代謝経路。

B) 野生型と *pad-1* 変異体の内生の IAA および IAA 前駆体の濃度 (平均値±標準偏差, $n=4$)。アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (** $p<0.01$)。

C) 組換え Pad-1 タンパク質 (上) およびコントロールの GUS タンパク質 (下) のアミノ基転移酵素反応液の MS クロマトグラム (m/z 値 205.2 > 146.1)。

D) 異なるアミノ酸をアミノ基供与体を用いた場合の組換え Pad-1 タンパク質のアミノ基転移酵素活性 (平均値±標準偏差, $n=3$)。

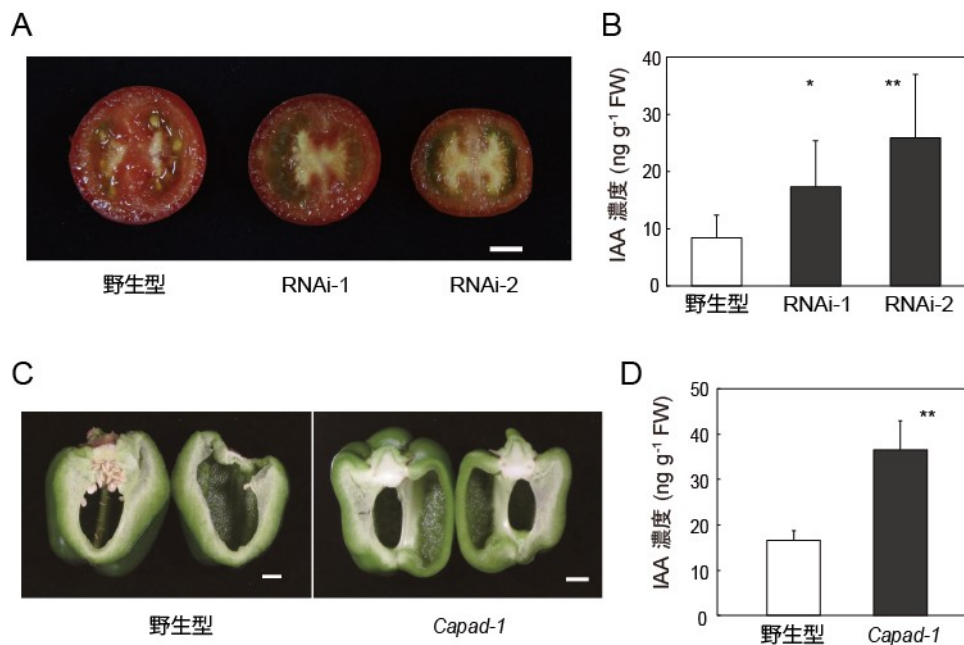


図 30 トマトとピーマンの *Pad-1* オルソログ遺伝子の機能抑制

- A) 野生型トマトの受粉果実（左）と *SlPad-1* RNAi 形質転換トマト (RNAi-1, RNAi-2) の単為結果果実（スケールバー = 1cm）。
- B) 野生型と *SlPad-1* RNAi 形質転換トマトの花芽の内生 IAA 濃度（平均値±標準偏差, $n = 6-8$ ）。
- C) 野生型ピーマンの受粉果実（左）と *Capad-1* 変異体の単為結果果実（右）（スケールバー = 1cm）。
- D) 野生型ピーマンと *Capad-1* 変異体子房の内生 IAA 濃度（平均値±標準偏差, $n = 4$ ）。アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。

表 10 *pad-1* 変異体と野生型ナス子房の内生アミノ酸濃度 (nmol g⁻¹ FW, 平均値±標準偏差, *n* = 4)

測定には、独立して 2 回栽培した植物体から採取した開花当日の子房を用いた。アスタリスクは、Student's *t* test に基づいた有意差を示す (* *p* < 0.05)。

	Experiment 1		Experiment 2	
	<i>pad-1</i>	野生型	<i>pad-1</i>	野生型
Ala	303±55	303.2±76	321.4±127.5	312.7±55.9
Arg	3049.7±1020.8	1167.9±949.8 *	1369.3±697.3	1827±1270.2
Asn	10.3±2.7	8.3±4.9	5.1±0.5	5.7±1.4
Asp	3885.2±405.9	4089.5±797.1	2394±797.9	3379±689.1
Gln	41.4±13.6	30.3±14.8	40.5±13.5	45.9±25.8
Glu	5824.3±1381.5	6212.3±703.3	5257.6±1008.3	5888.2±431.8
Gly	147.5±43.2	123.8±34.7	159±67.7	177.5±95.3
His	898.3±148.1	586.6±248.5	724.1±294	694.3±357
Ile	559.8±173.5	444±173.7	300.4±71.9	387.3±161.6
Leu	332±183.2	283.9±205.7	212.8±84.8	277.2±171
Lys	2923.1±1259.3	3032.3±1243.5	1582.1±180.5	1983.2±467.8
Met	25.3±7.6	24.2±6	17.1±3.9	17.7±4.7
Phe	632±79	799.2±243.9	190.2±38.9	296.7±53.9 *
Pro	2641.5±558.3	2052.7±1000.3	3389.7±626.3	4246.7±1299
Ser	2646.6±388.4	3164.7±738.9	2803.8±485	3402.6±488.3
Thr	1391.7±295.6	1307.6±555.8	934±50.5	1168.3±383.7
Tyr	113.7±39.3	157.5±99.5	26.9±7	48.9±11 *
Val	2846.8±1384.8	2844.4±1329	1315.3±166	1636.3±549.4

考察

本章の研究では、ナス *pad-1* 変異体の単為結果性の原因遺伝子の解析を行った。*pad-1* は、Miyatake ら (2012) によってマッピングされていたヨーロッパのナス由来の単為結果性の QTL の *Cop8.1* や *Cop3.1* と同一遺伝子座のアリルではなく、トマトの *SlPad-1* は既報のいくつかの単為結果遺伝子座と染色体上の位置が異なっていたことから、新奇の単為結果原因遺伝子であった。*pad-1* 変異体の子房には高濃度の IAA が蓄積しているが、それ以外の地上部の器官の内生 IAA 濃度は WT とほぼ同等であった (図 25D-F)。このことから、*pad-1* 変異体は、Rotino らの研究 (1997) で作出された細菌のオーキシン合成酵素遺伝子の子房に特異的に発現させることにより単為結果させた遺伝子組換えナスと特徴が類似している。

野生型 *Pad-1* はアミノ基転移酵素をコードし、シロイヌナズナの *VAS1* 遺伝子と高い配列相同性を示した。シロイヌナズナの *vas-1* は、オーキシン合成酵素のトリプトファンアミノ基転移酵素 TAA1 の変異体 (*taal*) が示す胚軸が短くなる形態を回復させる変異として発見された (Zheng et al., 2013)。VAS1 タンパク質は、メチオニンを主なアミノ基供与体として用い、TAR タンパク質が触媒する反応の逆反応である IPyA から Trp へ変換するアミノ基転移反応を触媒することにより、内生の IAA 調節に関与していると考えられている。また、Pieck らの研究では、VAS1 タンパク質は IPyA から Trp への変換以外に他のアミノ酸の代謝反応にも関わっていることを示唆している (Pieck et al., 2015)。本章の研究では、組換え *Pad-1* タンパク質は、アミノ基供与体として用いるアミノ酸の特異性は異なるものの、VAS1 タンパク質と同じ IPyA から Trp への反応を触媒した (図 29C, D)。*pad-1* 変異体ナス子房の内生 IPyA 濃度は WT よりも有意に高く (図 29B)、主要アミノ酸の内生濃度は、WT との間に明確な差は見られなかったことから (表 10)、ナス子房で *Pad-1* タンパク質が行う主な反応は、IPyA から Trp への変換であると考えられる。

シロイヌナズナの *vas1* 変異体の研究は、幼植物体の胚軸伸長を促進させるために FR 光の比率を増加させた環境で生育させるなどの特殊な環境条件で行われており、通常の生育における VAS1 の内生 IAA 調節への役割は十分に明らかにはされていない (Zheng et al., 2013; Pieck et al., 2015)。本章の研究は、異なる 3 種のナス科植物の子房の発達過程の IAA 調節において、*Pad-1* 遺伝子が重要な役割を持つことを明らかにした。第 3 章で述べたように、通常、受粉前の子房の内生オーキシン濃度は低く、AUX/IAA タンパク質が転写因子の ARF タンパク質の働きを阻害し、子房の肥大が抑制されているが、受粉による内生オーキシン増加はこの抑制を解除し、果実肥大を開始させると考えられる (Goetz et al., 2006; Pandolfini et al., 2007)。Serrani ら (2010) は、オーキシン輸送阻害剤の N-1-ナフチルフタラミン酸を未受粉のトマト子房の花柄部に処理し、子房外へ

のオーキシン排出を抑えると果実が肥大することを確認しており、未受粉の状態でも子房内でオーキシン生合成が行われていることを示唆している。これを裏付けるように、野生型ナスの子房では、IAA 生合成酵素遺伝子 (*SmTAR1* と *SmYUC1*) の発現が開花当日まで増加した (図 28B)。しかしながら、野生型の子房では、内生 IAA 濃度は子房の発達とともに減少し、開花当日まで低いレベルが保たれていた (図 28C)。これに対し、*Pad-1* 遺伝子の発現は、子房の発達と共に徐々に上昇し、開花当日にピークとなる (図 28A)。野生型の子房では *Pad-1* の発現は開花後に低下するが、これは、受粉がその発現を抑制するためと考えられる。これらの結果は、*Pad-1* タンパク質は、内生 IPyA 含量を低下させることにより、新規の IAA 生合成を抑制していることを示唆している。よって、野生型の *Pad-1* タンパク質は、未受粉の子房の IAA 蓄積を阻害し、種子の無い果実ができること妨げる役割を持つと考えられる。*Pad-1* 遺伝子と同じように、第 3 章で解析したトマトの未受粉の子房では、オーキシン不活性化酵素遺伝子の *SIGH3-9* と *SIGH3-15* の発現は高かった (図 16)。さらに、上述の Serrani ら (2010) の研究は、トマトの未受粉の子房では、受粉するまでの間は過剰な IAA が排出されることが単為結果が起これないために必要であることを示唆している。通常、植物細胞内の活性型オーキシンは、生合成、不活性化、輸送などの複数の機構の組み合わせによって厳密にコントロールされている (Ljung., 2013)。これらのことから、ナスやトマトの受粉前の子房には、内生オーキシン量を厳密に調節し、着果と果実肥大を適切にコントロールするためのメカニズムが存在すると考えられる。

本章の研究で得られた重要な知見の一つは、*pad-1* 変異は、ナス以外のナス科植物にも単為結果性をもたらすことである。ピーマンに単為結果性を導入することは、育種面で大変期待されている。単為結果性は、着果性の向上により生産性を向上させるだけでなく、得られる果実は無種子になることから、消費者や食品加工業者にとって大変望ましいものとなる。これまで、単為結果性を示すピーマンの系統がいくつか報告されているが、果実が十分に肥大し、多くの種子が得られるものは無く、関係する遺伝子も明らかにされていなかった (Tiwari et al., 2011)。また、Tiwari ら (2013) の研究では、外生処理の効果から、ピーマンの果実形成にオーキシンが重要であることを示唆しているが、受粉後の果実発達初期の内生 IAA の明確な増加は確認されていなかった。本章の研究結果では、*Capad-1* 変異体の子房の内生 IAA 濃度は、野生型よりも有意に高かったことから、ピーマンの果実形成において、内生 IAA 含量が重要であることが示された。今後の *Capad-1* 変異体の解析により、ピーマンの果実形成の機構に関するさらなる知見が得られると考えられる。

いくつかの単為結果系統では、種子が得られにくいことが品種育成を妨げる原因の一つとなっている。*pad-1* 変異体では受粉が起こると種子が形成され、変異を選抜するための DNA マーカーも利用可能であることから、これを利用したナスの育種が可能である。さらに、*Capad-1* 変異体を用いたピーマンの育種も期待される。単為結果系統は高

温などの不良環境でも高い着果性を示す。近年の温暖化の進行は果実形成に悪影響を及ぼし、果菜類の生産性を低下させると考えられているが、*pad-1* 変異の利用はこれらを解決する有効な方法になると考えられる。

摘要

通常、果実の発達には受粉とそれに続く受精の後に起こるが、単為結果性を持つ系統ではこれらが無くても果実が肥大する。これらの系統は、高温などの不良環境下でも良く着果し、収量を安定させることから、品種の育成に大変有用である。これまでに、単為結果性を示すナス科果菜類がいくつか報告されているが、広く実用的に用いられているものは少なく、それらの分子メカニズムの理解は進んでいなかった。本章の研究では、子房に高濃度の IAA を蓄積する新奇のナス単為結果変異体 *pad-1* の解析を行った。マップベースクローニングにより原因候補遺伝子を単離したところ、野生型の *Pad-1* 遺伝子は、アミノ基転移酵素をコードし、シロイヌナズナの *VASI* 遺伝子と相同性が高いことが明らかとなった。組換え Pad-1 タンパク質は、オーキシシン生合成酵素の TAA1/TARs の触媒する反応の逆反応の IPyA から Trp に変換する反応を触媒した。野生型ナスの *Pad-1* 遺伝子の発現量は子房の発達と共に増加し、開花当日にピークとなった。これは、Pad-1 タンパク質が子房の過剰な IAA 蓄積を阻害し、受粉前の子房の肥大を抑制する役割を持つことを示唆している。さらに、*Pad-1* のオルソログ遺伝子の抑制は、同じナス科果菜類のトマトやピーマンにも単為結果性をもたらすことが明らかとなった。本章の結果は、*Pad-1* 遺伝子の抑制が、ナス科果菜類に単為結果性を導入し、着果を安定させる強力な方法となることを示唆している。

第6章 総合考察

植物ホルモンの調節機構

本研究を通して、トマトの成長に大きな変化が起きるときに内生の植物ホルモンは局所的、時期特異的に厳密に制御されることが示された。果実形成期では、通常の果実発達開始に必須となる受粉は、植物ホルモンの代謝を変化させる明確なトリガーとなっている。オーキシシンやサイトカイニン生合成の鍵酵素である IPT や YUCCA などコードする遺伝子群は、受粉に応答して速やかに発現が上昇し、逆に不活性化酵素遺伝子の発現は抑制される。また、苗の生育においては、ある強度以上の B 光が含まれるかどうかで GA 生合成酵素遺伝子の *SIGA3ox3* の発現が劇的に変化し、活性型 GA の調節を通して茎の伸長に影響する。これらの厳密な制御は、植物が生体内外の刺激を素早く感じ取り、内生植物ホルモンの調節を介して成長を制御する生存戦略をとっているために行われていると考えられる。内生植物ホルモンの調節機構を把握することは、植物成長調節剤等を用いた成長制御を効果的に行う上で大変重要である。

興味深いことに、GA やサイトカイニンなどの活性型物質が複数存在する植物ホルモン (GA₁ と GA₄、iP と tZ など) は、部位や成長段階で決まった経路が活性化されていた。本研究のトマトの苗の伸長制御では、GA₄ が主に関与していることが明らかとなったが、果実肥大時には、GA₁ の経路の物質が増加することが確認されている (Serrani et al., 2007b; Mariotti et al., 2011)。また、イネなどの他の植物でも、栄養器官と生殖器官で蓄積する活性型 GA が異なることが報告されている (Kobayashi et al., 1989)。これらの物質間の明確な役割の違いは十分に解明されていないが、構造的に水酸基の有無等が異なることから、極性の違いが必要とされる部位と関係している可能性が考えられる。

果実形成と植物ホルモン

第2章、第3章および第5章では、果実形成期におけるサイトカイニンとオーキシシンの制御機構について解析した。これまで、果実と植物ホルモンの関係については、商業的流通と関係する果実成熟についての研究が中心になされており、特に、成熟におけるエチレンの制御と役割について詳細に解析されてきた。果実の肥大と植物ホルモンの関係は、収量に直結する内容であるものの、成熟機構の研究と比較すると遅れており、オーキシシン、GA、サイトカイニンが初期の果実発達に関与する主要な物質と考えられていたが (Gillaspy, 1993)、これらの制御の詳細な研究がなされるようになったのは、その代謝経路がシロイヌナズナ等のモデル植物で明らかにされてからである。本研究で解析を行ったオーキシシンやサイトカイニンは、受粉直後から子房での生合成が始まり、3～5 日後にはピークとなることから、主に細胞分裂期 (フェイズII) に関係していると考えられる。この結果は、これらの外生処理が、細胞分裂を促進することとも一致してい

る。一方、GA とトマトの果実形成の関係は、これまで研究が進んでおり、Serrani ら (2007a,b) は、GA 代謝酵素遺伝子群の発現が受粉で制御されること、GA が主に細胞肥大（フェイズIII）と関係していることを報告している。また、一部の GA 代謝酵素群の遺伝子発現は、子房への外生的なオーキシシンやサイトカイニン処理で制御され、GA の蓄積が促進することから、トマトの果実形成において、これらの植物ホルモンの下流で部分的に制御されていると考えられている（Serrani et al., 2008; Ding et al., 2013）。その他の植物ホルモンでは、ABA やエチレンは果実の肥大に対して抑制の効果があると考えられている。様々な植物において、ABA は出芽や種子発芽等を抑制する休眠物質としての役割を持つ。トマトの受粉前の子房には、ABA が蓄積しており、受粉後に速やかに ABA8'位水酸化酵素（CYP707A サブファミリー）により不活性化されることが報告されている（Nitch et al., 2009）。この未受粉の子房に蓄積している ABA は、他の器官における休眠の作用と同様に、未受粉の状態で果実器官が発達することを抑制する役割を持つ可能性があると考えられている。また、エチレンは、受粉や受精不良等で着果できずに不要となった子房を老化させる働きを持つと考えられており、GA 生合成の抑制や ABA の蓄積に関与し、受粉やオーキシシン処理で働きが抑制されることが報告されている（Shinozaki et al., 2015）。以上のように、果実形成初期では、様々な植物ホルモンがクロストークにより制御され、発達をコントロールしていると考えられる（図31）。現在も様々な知見が得られていることから、今後の研究でさらなる詳細な機構が明らかになることが期待される。

植物ホルモンの制御機構の植物の生育制御への利用

第2章では、合成サイトカイニンの CPPU 処理が果実肥大に及ぼす影響を解析したが、これまでサイトカイニンがトマトの果実組織に及ぼす影響は明らかにされておらず、本研究で細胞分裂を促進する効果を持つことを組織解剖学的に示した。最近、CPPU 処理は商品価値低下につながる果実の障害である裂果を抑制する効果を持つことが明らかにされ（佐野ら 2018）、トマトでの植物成長調節剤としての使用法が拡大された。この裂果の抑制は、CPPU 処理が果実の表皮付近の細胞数を増加にさせるために起こると考えられている。また、第3章では、果実発達において内生 IAA がピークとなる時期や外生オーキシシン処理や受粉の刺激が内生 IAA を増加させるメカニズムを示した。この知見は、現在着果促進に使用されている植物成長調節剤（合成オーキシシン）の使用法の改良につながると考えられる。このように、外生ホルモン処理の効果やそのメカニズムを調べる研究は、今後も新しい植物成長調節剤使用法の開発につながると考えられる。

第4章では、トマト苗の徒長抑制には GA の過剰な蓄積を抑えることが重要であることを示した。徒長を防止するには、GA 生合成阻害剤のユニコナゾールやパクロブトラゾール等の使用も効果が期待できるが、GA は果実肥大などにも重要な役割を持ち、これらの処理が茎伸長以外の生育に影響する場合があるため（Serrani et al., 2008）、使用に

は注意が必要である。本研究により、B 光強度の調節により GA 代謝をコントロールで
きる事が明らかになったが、栽培環境を変化させることでも内生植物ホルモンを調節
することが可能である。栽培環境の変化と内生植物ホルモン調節との関係を調べ、環境
制御と植物成長調節剤の処理を組み合わせることにより、より効果的な生育制御法の開
発が可能であると考えられる。

第 5 章では、ナスの単為結果性の原因が内生 IAA の調節に関わる遺伝子の一つの *Pad-1*
の変異であることを解明し、この遺伝子の抑制が他のナス科果菜類への単為結果性導
入に利用できることを明らかにしたことから、植物ホルモン調節機構の利用が品種開発
につながることを示した。*Pad-1* と相同性が高い遺伝子はナス科以外の果菜類にも存在
することから、変異誘発やゲノム編集等の技術により、単為結果品種を開発するための
ターゲットとなると考えられる。さらに、第 3 章の研究で示したとおり、果実発達期の
IAA 調節には、他にも鍵となる遺伝子がいくつか存在することから、複数の遺伝子の制
御を組み合わせることにより、より高機能な品種の開発につながることを期待できる。

トマトの栽培は、植物体の成長と花や果実形成の促進を同時に行わなければならない
ため、栄養成長と生殖成長のバランスをとることが重要である。植物ホルモンは生育の
様々な面に関わっており、それらを適切に制御することは、果実の安定生産につながる。
また、モデル植物のトマトで得られる知見は、ナスやピーマンをはじめ、他の果菜類に
応用できる場合が多い。今後、ゲノム情報の利用によるホルモン関連遺伝子の網羅的解
析や変異体の解析、関連物質の精密定量分析、外生処理実験等を組み合わせることによ
り、果実の収量向上のための植物成長調節剤使用法の改良や栽培環境の調節、および有
用品種開発のための知見がますます得られることが期待される。

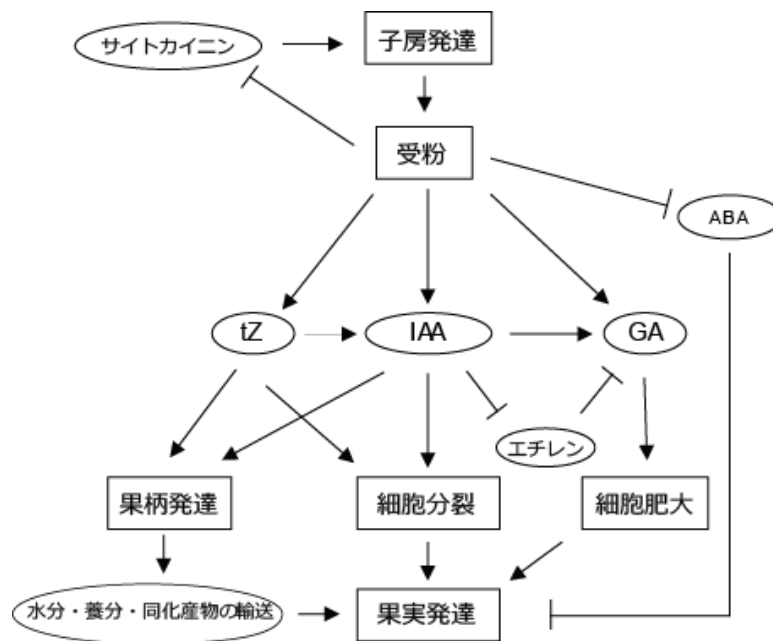


図 31 トマト果実発達における植物ホルモンの役割と調節のモデル。サイトカイニンは、受粉前の子房の発達に関与している。受粉後に tZ、IAA および GA が増加し、細胞分裂や細胞肥大を促進し、果実を肥大させる。tZ と IAA は、果柄の発達にも関与し、水分や養分、同化産物の果実への輸送を促進している。ABA とエチレンは、受粉の無い状態の子房が肥大することを抑制している。

Abstract

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the important vegetable crops in Japan. In order to improve and stabilize the yield of tomato, it is necessary to control the vegetative and reproductive development appropriately. In this study, we investigated the physiological and molecular mechanisms of plant hormone metabolism which control tomato fruit and seedling development. An understanding of the roles and regulation of plant hormones will provide the useful information for improvement of the productivity of tomato and other fruit crops.

Cytokinins (CKs) have been thought to play important roles in tomato fruit development. In chapter 2, we analyzed the variations in the levels of CKs in developing tomato fruits to understand the metabolic regulation of CKs. We found that the concentrations of isopentenyladenine (iP) and CK ribosides were high in ovaries at anthesis and decreased afterward, whereas the level of *trans*-zeatin (tZ) increased after anthesis. These results suggest that different types of CKs may have different roles during fruit development. To understand the roles of CK in fruit development, we investigated the effect of synthetic CK, *N*-(2-chloro-pyridin-4-yl)-*N'*-phenylurea (CPPU), treatment on fruit growth. We found that application of CPPU to unpollinated ovaries enlarged fruits via increasing cell number rather than cell expansion. These results suggest that CKs are involved in cell division during early fruit development.

Auxin has been recognized as a plant hormone that plays crucial roles in many aspects of fruit development. However, the regulation of auxin metabolism in fruit development has not been well understood. In chapter 3, we analyzed the variations in the levels of endogenous auxin, indole-3-acetic acid (IAA), as well as the variations in the expression of the genes involved in IAA biosynthesis and inactivation in developing tomato fruits. We found that the concentrations of IAA decreased at anthesis and increased after pollination in the ovary. Expression analysis

showed that the transcript levels of the auxin biosynthetic-enzyme genes increased after pollination, whereas the transcripts of the auxin inactivating-enzyme genes were accumulated at anthesis stage and decreased after pollination. Moreover, we found that treatment of synthetic auxin on the unpollinated ovaries increased the transcript levels of the auxin biosynthetic-enzyme genes and decreased those of the auxin inactivating-enzyme genes. These results suggest that pollination or exogenous auxin application increase auxin concentration in the ovaries, and the auxin burst promotes fruit development.

In cultivation of tomato, transplanting high-quality seedlings is important to stabilize fruit yield, and the control of plant morphology is crucial in production of seedlings. Light quality is one of the important environmental factors controlling stem length of tomato. Previous studies showed that the stem length of tomato seedlings grown under blue (B) light was shorter than that of seedlings grown under red (R) light. In chapter 4, we attempted to clarify the mechanism of how B and R lights control stem length. The level of bioactive GA was significantly higher in the seedlings grown under R light than in those grown under B light or a mixture of B and R lights. We also found that an increase in the B to R light ratio increased the transcript level of the GA inactivating-enzyme gene, whereas the transcript level of the GA biosynthetic-enzyme gene in the seedlings grown under R light was significantly higher than that under other conditions. These results indicated that the B light intensity controlled GA contents through the regulation of GA inactivation and biosynthesis, and endogenous GA contents may affect stem elongation.

Fruit development normally occurs after pollination and subsequent fertilization. However, these processes are inhibited under unfavorable environmental conditions, such as high or low temperature. Parthenocarpy, which is the growth of ovary into the fruit without pollination and/or fertilization has been thought as a desirable agronomic trait because it stabilizes fruit yield. In chapter 5, we investigated the parthenocarpic eggplant mutant, *pad-1*, to understand the

mechanism of parthenocarpy. We found that *pad-1* mutant contained high levels of auxin in the ovaries and had a mutation in the aminotransferase gene named *Pad-1*. The wild-type Pad-1 protein catalyzed the reverse reaction of auxin biosynthetic-enzyme and was involved in auxin homeostasis. Moreover, manipulation of the orthologous genes of *Pad-1* induced parthenocarpy in tomato and pepper plants. These results suggest that the use of *pad-1* genes could increase fruit productivity of Solanaceae plants.

謝辞

本研究は、著者が所属している国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究部門（前独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構野菜茶業研究所）において進められたものである。研究を進行する上で、旧生育生理研究室の本多一郎室長（現前橋工科大学）、旧野菜ゲノム研究チームの福岡浩之チーム長（現タキイ種苗株式会社）、菊地郁博士（現宮城大学）、福田真知子博士、今西俊介博士、宮武宏治博士には、様々な面においてご指導ご鞭撻をいただきました。誠に感謝申し上げます。また、真川節子さん、松田繁美さん、荒木照代さん、佐南公さん、寺家綾子さん、根来里美さんには、トマトの栽培やサンプリング、実験の実施において多大なご協力をいただきました。誠に感謝申し上げます。

第4章の研究は、千葉大学大学院園芸研究科と共同で実施したものであり、用いたサンプルは全て千葉大学において栽培されたものである。研究を進めるにあたり、後藤英司教授、南谷健司博士には、様々なご指導、ご協力をいただきました。誠に感謝申し上げます。

第5章の研究は、タキイ種苗株式会社と共同で実施したものであり、ナスとピーマンの解析材料は、同社から提供されたものである。誠に感謝申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、神戸大学大学院農学研究科の土佐幸雄教授、森直樹教授、乾秀之准教授には大変親切なご指導をいただきました。誠に感謝申し上げます。

本論文の第4章は、園芸学会英文誌である *The Horticulture Journal* に掲載された以下の原著論文を基に作成しましたが、原著論文中の図及び表の転載について、一般社団法人園芸学会から許可をいただきました。

Matsuo S, Nanya K, Imanishi S, Honda I, Goto E. 2019. Effects of blue and red lights on gibberellin metabolism in tomato seedlings. *The Horticulture Journal*, 88, 76–82.

引用文献

- Abad M, Monteiro AA.** 1989. The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions - A review. *Sci. Hortic.* 38, 167–192.
- Abdel-Rahman M.** 1977. Patterns of hormones, respiration and ripening enzymes during development, maturation ripening of cherry tomato fruits. *Physiol. Plant.* 39, 115–118.
- Abu-Zaitoon YM, Bennett, K., Normanly J, Nonhebel HM.** 2012. A large increase in IAA during development of rice grains correlates with the expression of tryptophan aminotransferase *OsTAR1* and a grain-specific *YUCCA*. *Physiol. Plant.* 146, 487–499.
- Argueso CT, Ferreira FJ, Kieber JJ.** 2009. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. *Plant Cell Environ.* 32, 1147–1160.
- Asahina M, Yamauchi Y, Hanada A, Kamiya Y, Kamada H, Satoh S, Yamaguchi S.** 2007. Effects of the removal of cotyledons on endogenous gibberellin levels in hypocotyls of young cucumber and tomato seedlings. *Plant Biotechnol.* 24, 99–106.
- Ashikari M, Sasaki A, Ueguchi-Tanaka M, Itoh H, Nishimura A, Datta S, Ishiyama K, Saito T, Kobayashi M, Khush GS, Kitano H, Matsuoka M.** 2002. Loss-of-function of a rice gibberellin biosynthetic gene, *GA20 oxidase (GA20ox-2)*, led to the rice 'green revolution'. *Breeding Sci.* 52, 143–150.
- Beraldi D, Picarella ME, Soressi GP, Mazzucato A.** 2004. Fine mapping of the *parthenocarpic fruit (pat)* mutation in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 108, 209–216.
- Billings S, Jelenkovic G, Chin CK, Eberhardt J.** 1997. The effect of growth regulators and antibiotics on eggplant transformation. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 122, 158–162.
- Bohner J, Bangerth F.** 1988. Cell number, cell-size and hormone levels in semi-isogenic mutants of *Lycopersicon-pimpinellifolium* differing in fruit size. *Physiol. Plant.* 72, 316–320.
- Böttcher C, Keyzers RA, Boss PK, Davies C.** 2010. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J. Exp. Bot.* 61, 3615–3625.
- Brugière N, Humbert S, Rizzo N, Bohn J, Habben JE.** 2008. A member of the maize isopentenyl transferase gene family, *Zea mays isopentenyl transferase 2 (ZmIPT2)*, encodes a cytokinin biosynthetic enzyme expressed during kernel development. *Plant Mol. Biol.* 67, 215–229.
- Brumos J, Alonso JM, Stepanova AN.** 2014. Genetic aspects of auxin biosynthesis and its regulation. *Physiol. Plant.* 151, 3–12.
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsöegöen A, Lima JE, Benedito VA, Peres LEP.** 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system:

- 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods* 7, 18.
- Casal JJ.** 2012. Shade Avoidance. *The Arabidopsis Book* 10, e0157. DOI: 10.1199/tab.0157.
- Chen S, Wang XJ, Zhang LY, Lin SS, Liu DC, Wang QZ, Cai SY, El-Tanbouly R, Gan LJ, Wu H, Li Y.** 2016. Identification and characterization of tomato gibberellin 2-oxidases (GA2oxs) and effects of fruit-specific *SIGA2ox1* overexpression on fruit and seed growth and development. *Hortic. Res.* 3, 16059.
- Cooney TP, Nonhebel HM.** 1991. Biosynthesis of indole-3-acetic-acid in tomato shoots - measurement, mass-spectral identification and incorporation of ^2H from $^2\text{H}_2\text{O}$ into indole-3-acetic-acid, D- and L-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 184, 368–376.
- de Wit M, Keuskamp DH, Bongers FJ, Hornitschek P, Gommers CMM, Reinen E, Martinez-Ceron C, Fankhauser C, Pierik R.** 2016. Integration of phytochrome and cryptochrome signals determines plant growth during competition for light. *Curr. Biol.* 26, 3320–3326.
- Ding J, Chen B, Xia X, Mao W, Shi K, Zhou Y, Yu J.** 2013. Cytokinin-induced parthenocarpic fruit development in tomato is partly dependent on enhanced gibberellin and auxin biosynthesis. *PLoS One*. 8, e70080.
- Dobrev PI, Kamínek M.** 2002. Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 950, 21–29.
- Emery RJN, Ma QF, Atkins CA.** 2000. The forms and sources of cytokinins in developing white lupine seeds and fruits. *Plant Physiol.* 123, 1593–1604.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA.** 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8, 131.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA.** 2011. Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: The ToFZY gene family. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 782–791.
- Ficcadenti N, Sestili S, Pandolfini T, Cirillo C, Rotino GL, Spena A.** 1999. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breed.* 5, 463–470.
- Flaishman MA, Shargal A, Stern RA.** 2001. The synthetic cytokinin CPPU increases fruit size and yield of 'Spadona' and 'Costia' pear (*Pyrus communis* L.). *J. Hortic. Sci. Biotech.* 76, 145–149.
- Foo E, Platten JD, Weller JL, Reid JB.** 2006. PhyA and cry1 act redundantly to regulate gibberellin levels during de-etiolation in blue light. *Physiol. Plant.* 127, 149–156.
- Fos M, Nuez F, García-Martínez JL.** 2000. The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.* 122,

471–479.

- Garcia-Martinez JL, Gil J.** 2001. Light regulation of gibberellin biosynthesis and mode of action. *J. Plant Growth Regul.* 20, 354–368.
- Ghanem ME, Albacete A, Smigocki AC, Frébort I, Pospíšilová H, Martínez-Andújar C, Acosta M, Sánchez-Bravo J, Lutts S, Dodd IC, Pérez-Alfocea F.** 2011. Root-synthesized cytokinins improve shoot growth and fruit yield in salinized tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *J. Exp. Bot.* 62, 125–140.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W.** 1993. Fruits - A Developmental Perspective. *Plant Cell* 5, 1439–1451.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM.** 2006. AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. *Plant Cell* 18, 1873–1886.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P.** 2005. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol.* 7, 131–139.
- Gorguet B, Eggink PM, Ocana J, Tiwari A, Schipper D, Finkers R, Visser RGF, van Heusden AW.** 2008. Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 116, 755–767.
- Hayata Y, Niimi Y, Inoue K, Kondo S.** 2000. CPPU and BA, with and without pollination, affect set, growth, and quality of muskmelon fruit. *HortScience* 35, 868–870.
- Hayata Y, Niimi Y, Iwasaki N.** 1995. Synthetic cytokinin - 1-(2-Chloro-4-Pyridyl)-3-Phenylurea (CPPU) - promotes fruit-set and induces parthenocarp in watermelon. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 120, 997–1000.
- He C, Saedler H.** 2007. Hormonal control of the inflated calyx syndrome, a morphological novelty, in *Physalis*. *Plant J.* 49, 935–946.
- Hedden P, Thomas SG.** 2012. Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* 444, 11–25.
- Hernández R, Eguchi T, Deveci M, Kubota C.** 2016. Tomato seedling physiological responses under different percentages of blue and red photon flux ratios using LEDs and cool white fluorescent lamps. *Sci. Hortic.* 213, 270–280.
- Higashide T, Nakano A, Yasuba K.** 2014. Yield and Dry Matter Production of a Japanese Tomato ‘Momotaro York’ Are Improved by Grafting onto a Dutch Rootstock ‘Maxifort’ *Hort. J.* 83, 235–243.
- Hirose F, Inagaki N, Hanada A, Yamaguchi S, Kamiya Y, Miyao A, Hirochika H, Takano M.** 2012. Cryptochrome and phytochrome cooperatively but independently reduce active gibberellin content in rice seedlings under light irradiation. *Plant Cell Physiol.* 53, 1570–1582.
- Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H.** 2008. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* 59,

75–83.

- Ho LC, Grange RI, Picken AJ.** 1987. An analysis of the accumulation of water and dry-matter in tomato fruit. *Plant Cell Environ.* 10, 157–162.
- Honda I, Matsunaga H, Kikuchi K, Matuo S, Fukuda M, Imanishi S.** 2017. Involvement of cytokinins, 3-indoleacetic acid, and gibberellins in early fruit growth in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Hort. J.* 86, 52–60.
- Ikeda H, Shibuya T, Imanishi S, Aso H, Nishiyama M, Kanayama Y.** 2016. Dynamic metabolic regulation by a chromosome segment from a wild relative during fruit development in a tomato introgression line, IL8-3. *Plant Cell Physiol.* 57, 1257–1270.
- Jones RJ, Schreiber BMN.** 1997. Role and function of cytokinin oxidase in plants. *Plant Growth Regul.* 23, 123–134.
- Kakimoto T.** 2001. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate : ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42, 677–685.
- Kobayashi M, Sakurai A, Saka H, Takahashi N.** Quantitative analysis of endogenous gibberellins in normal and dwarf cultivars of rice. 1989. *Plant Cell Physiol.* 30, 963–969.
- Kotoda N, Matsuo S, Honda I, Yano K, Shimizu T.** 2016. Isolation and functional analysis of two gibberellin 20-oxidase genes from satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Hort. J.* 85, 128–140.
- Kozai T.** 2013. Resource use efficiency of closed plant production system with artificial light: Concept, estimation and application to plant factory. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 89, 447–461.
- Kriechbaumer V, Botchway SW, Hawes C.** 2016. Localization and interactions between *Arabidopsis* auxin biosynthetic enzymes in the TAA/YUC-dependent pathway. *J. Exp. Bot.* 67, 4195–4207.
- Kumar R, Agarwal P, Tyagi AK, Sharma AK.** 2012. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive *GH3* genes during development and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mol. Genet. Genomics* 287, 221–235.
- Kurakawa T, Ueda N, Maekawa M, Kobayashi K, Kojima M, Nagato Y, Sakakibara H, Kyojuka J.** 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445, 652–655.
- Kurepin LV, Pharis RP.** 2014. Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. *Plant Sci.* 229, 280–289.
- Kuroda M, Kimizu M, Mikami C.** 2010. A simple set of plasmids for the production of transgenic plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 2348–2351.
- Kuroha T, Tokunaga H, Kojima M, Ueda N, Ishida T, Nagawa S, Fukuda H, Sugimoto K, Sakakibara H.** 2009. Functional Analyses of *LONELY GUY* Cytokinin-Activating Enzymes

- Reveal the Importance of the Direct Activation Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 3152–3169.
- Lewis DH, Burge GK, Schmierer DM, Jameson PE.** 1996. Cytokinins and fruit development in the kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). I. Changes during fruit development. *Physiol. Plant.* 98, 179–186.
- Liao DH, Chen X, Chen AQ, Wang HM, Liu JJ, Liu JL, Gu M, Sun SB, Xu GH.** 2015. The characterization of six auxin-induced tomato GH3 genes uncovers a member, *SIGH3.4*, strongly responsive to arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell Physiol.* 56, 674–687.
- Ljung K.** 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943–950.
- Lin CT.** 2002. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14, s207–s225.
- Liu X, Hegeman AD, Gardner G, Cohen JD.** 2012. Protocol: High-throughput and quantitative assays of auxin and auxin precursors from minute tissue samples. *Plant Methods* 8, 31.
- Mano Y, Nemoto K.** 2012. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J. Exp. Bot.* 63, 2853–2872.
- Mapelli S.** 1981. Changes in cytokinin in the fruits of parthenocarpic and normal tomatoes. *Plant Sci. Lett.* 22, 227–233.
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP.** 1978. Relationship between set, development and activities of growth-regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* 19, 1281–1288.
- Mariotti L, Picciarelli P, Lombardi L, Ceccarelli N.** 2011. Fruit-set and early fruit growth in tomato are associated with increases in indoleacetic acid, cytokinin, and bioactive gibberellin contents. *J. Plant Growth Regul.* 30, 405–415.
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shirasu K, Yao H, McSteen P, Zhao Y, Hayashi K-i, Kamiya Y, Kasahara H.** 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18512–18517.
- Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T.** 2008. Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20027–20031.
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP.** 1998. The *parthenocarpic fruit (pat)* mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* 125, 107–114.
- McCree KJ.** 1972. Action spectrum, absorptance and quantum yield of photosynthesis in crop plants. *Agric. Meteorol.* 9, 191–216.
- Mellor N, Band LR, Pěnčík A, Novák O, Rashed A, Holman T, Wilson MH, Voß U, Bishopp A, King JR, Ljung K, Bennett MJ, Owen MR.** 2016. Dynamic regulation of auxin oxidase

- and conjugating enzymes *AtDAO1* and *GH3* modulates auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 11022–11027.
- Miyatake K, Saito T, Negoro S, Yamaguchi H, Nunome T, Ohyama A, Fukuoka H.** 2012. Development of selective markers linked to a major QTL for parthenocarpy in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Theor. Appl. Genet.* 124, 1403–1413.
- Miyawaki K, Matsumoto-Kitano M, Kakimoto T.** 2004. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J.* 37, 128–138.
- Miyawaki K, Tarkowski P, Matsumoto-Kitano M, Kato T, Sato S, Tarkowska D, Tabata S, Sandberg G, Kakimoto T.** 2006. Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16598–16603.
- Mok DWS, Mok MC.** 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 89–118.
- Nakaune M, Hanada A, Yin YG, Matsukura C, Yamaguchi S, Ezura H.** 2012. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiol. Biochem.* 52, 28–37.
- Nanya K, Ishigami Y, Hikosaka S, Goto E.** 2012. Effects of blue and red light on stem elongation and flowering of tomato seedlings. *Acta Hortic.* 956, 261–266.
- Nieminen K, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y.** 2008. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20032–20037.
- Ninu L, Ahmad M, Miarelli C, Cashmore AR, Giuliano G.** 1999. Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *Plant J.* 18, 551–556.
- Nishihara M, Ito M, Tanaka I, Kyo M, Ono K, Irifune K, Morikawa H.** 1993. Expression of the β -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana rustica*, and Peony (*Peonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol.* 102, 357–361.
- Nishio S, Moriguchi R, Ikeda H, Takahashi H, Fujii N, Guilfoyle TJ, Kanahama K, Kanayama Y.** 2010. Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* 232, 755–764.
- Nitsch LMC, Oplaat C, Feron R, Ma Q, Wolters-Arts M, Hedden P, Mariani C, Vriezen WH.** 2009. Absciscic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta* 229, 1335–1346.
- Normanly J., Cohen JD, Fink GR.** 1993. *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-

- independent biosynthetic-pathway for indole-3-acetic-acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10355–10359.
- Nothmann J, Rylski I, Spigelman M.** 1983. Interactions between floral morphology, position in cluster and 2,4-D treatments in 3 eggplant cultivars. *Sci. Hortic.* 20, 35–44.
- Novák O, Henyková E, Sairanen I, Kowalczyk M, Pospíšil T, Ljung K.** 2012. Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J.* 72, 523–536.
- Ohara H, Izawa J, Kimura S, Hiroi N, Matsui H, Hirata N, Takanashi E.** 1997. Induction of fruit set and growth of parthenocarpic 'Hayward' kiwifruit with plant growth regulators. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 66, 467–473.
- Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Mariotti, L., Ceccarelli, N., Soressi, G.P. and Mazzucato, A.** 2007. Tomato fruit set driven by pollination or by the *parthenocarpic fruit* allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* 226, 877–888.
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F.** 2002. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* 14, S61–80.
- Pandolfini T, Molesini B, Spena A.** 2007. Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci.* 12, 327–329.
- Pattison RJ, Catalá C.** 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and *AUX/LAX* gene families. *Plant J.* 70, 585–598.
- Pattison RJ, Csukasi F, Catalá C.** 2014. Mechanisms regulating auxin action during fruit development. *Physiol. Plant* 151, 62–72.
- Pedmale UV, Huang SSC, Zander M, Cole BJ, Hetzel J, Ljung K, Reis PAB, Sridevi P, Nito K, Nery JR, Ecker JR, Chory J.** 2016. Cryptochromes interact directly with PIFs to control plant growth in limiting blue light. *Cell* 164, 233–245.
- Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, Beales J, Fish LJ, Worland AJ, Pelica F, Sudhakar D, Christou P, Snape JW, Gale MD, Harberd NP.** 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400, 256–261.
- Pernisová M, Klíma P, Horák J, Válková M, Malbeck J, Souček P, Reichman P, Hoyerová K, Dubová J, Friml J, Zažímalová E, Hejátko J.** 2009. Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3609–3614.
- Pieck M, Yuan Y, Godfrey J, Fisher C, Zolj S, Vaughan D, Thomas N, Wu C, Ramos J, Lee N, Normanly J, Celenza, JL.** 2015. Auxin and Tryptophan Homeostasis Are Facilitated by the ISS1/VAS1 Aromatic Aminotransferase in *Arabidopsis*. *Genetics* 201, 185–199.
- Porco S, Pěňčík A, Rashed A, Voß U, Casanova-Sáez R, Bishopp A, Golebiowska A, Bhosale R, Swarup R, Swarup K, Peňáková P, Novák O, Staswick P, Hedden P, Phillips AL, Vissenberg K, Bennett MJ, Ljung K.** 2016. Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls

- IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 11016–11021.
- Purgatto E, do Nascimento JRO, Lajolo FM, Cordenunsi BR.** 2002. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. *J. Plant Physiol.* 159, 1105–1111.
- Quittenden LJ, Davies NW, Smith JA, Molesworth PP, Tivendale ND, Ross JJ.** 2009. Auxin biosynthesis in pea: characterization of the tryptamine pathway. *Plant Physiol.* 151, 1130–1138.
- Ramin AA.** 2003. Effects of auxin application on fruit formation in tomato growing under stress temperatures in the field. *J. Hortic. Sci. Biotech.* 78, 706–710.
- Rebers M, Kaneta T, Kawaide H, Yamaguchi S, Yang YY, Imai R, Sekimoto H, Kamiya Y.** 1999. Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato. *Plant J.* 17, 241–250.
- Rijavec T, Jain M, Dermastia M, Chourey PS.** 2011. Spatial and temporal profiles of cytokinin biosynthesis and accumulation in developing caryopses of maize. *Ann. Bot.* 107, 1235–1245.
- Rotino GL, Perri E, Zottini M, Sommer H, Spena A.** 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotechnol.* 15, 1398–1401.
- Růžicka K, Šimášková M, Duclercq J, Petrášek J, Zažímalová E, Simon S, Friml J, Van Montagu MCE, Benková E.** 2009. Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 4284–4289.
- Sakakibara H.** 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 431–449.
- Serrani JC, Carrera E, Ruiz-Rivero O, Gallego-Giraldo L, Pereira Peres LE, García-Martínez JL.** 2010. Inhibition of auxin transport from the ovary or from the apical shoot induces parthenocarpic fruit-set in tomato mediated by gibberellins. *Plant Physiol.* 153, 851–862.
- Serrani JC, Fos M, Atarés A, García-Martínez JL.** 2007a. Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv Micro-Tom of tomato. *J. Plant Growth Regul.* 26, 211–221.
- Serrani JC, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL.** 2008. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *Plant J.* 56, 922–934.
- Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL.** 2007b. Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol.* 145, 246–257.
- Shani E, Ben-Gera H, Shleizer-Burko S, Burko Y, Weiss D, Ori N.** 2010. Cytokinin regulates compound leaf development in tomato. *Plant Cell* 22, 3206–3217.
- Shinozaki Y, Hao S, Kojima M, Sakakibara H, Ozeki-Iida Y, Zheng Y, Fei Z, Zhong S, Giovannoni JJ, Rose JK, Okabe Y, Heta Y, Ezura H, Ariizumi T.** 2015. Ethylene suppresses tomato fruit set through modification of gibberellin metabolism. *Plant J.* 83, 237–251.

- Singh H, Kumar P, Chaudhari S, Edelstein M.** 2017. Tomato grafting: a global perspective. *HortScience* 52, 1328-1336.
- Spíchal L, Rakova NY, Riefler M, Mizuno T, Romanov GA, Strnad M, Schmülling T.** 2004. Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant Cell Physiol.* 45, 1299-1305.
- Spielmeyer W1, Ellis MH, Chandler PM.** 2002. Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9043–9048.
- Srivastava A, Handa AK.** 2005. Hormonal regulation of tomato fruit development: A molecular perspective. *J. Plant Growth Regul.* 24, 67–82.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W.** 2005. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17, 616–627.
- Stepanova AN, Alonso JM.** 2016. Auxin catabolism unplugged: role of IAA oxidation in auxin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 10742–10744.
- Stepanova AN, Robertson-Hoyt J, Yun J, Benavente LM, Xie DY, Doležal K, Schlereth A, Jürgens G, Alonso JM.** 2008. *TAA1*-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133, 177–191.
- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novák O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM.** 2011. The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell* 23, 3961–3973.
- Stern RA, Ben-Arie R, Neria O, Flaishman M.** 2003. CPPU and BA increase fruit size of 'Royal Gala' (*Malus domestica*) apple in a warm climate. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* J. Hortic. Sci. Biotech. 78, 297–302.
- Stolz A, Riefler M, Lomin SN, Achazi K, Romanov GA, Schmuelling T.** 2011. The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant J.* 67, 157–168.
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H.** 2009. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5430–5435.
- Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H.** 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol.* 47, 426–431.
- Suzuki M, Yamazaki C, Mitsui M, Kakei Y, Mitani Y, Nakamura A, Ishii T, Soeno K, Shimada Y.** 2015. Transcriptional feedback regulation of *YUCCA* genes in response to auxin levels in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 34, 1343–1352.
- Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T.** 2001. Identification of genes encoding adenylate

- isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 276, 26405–26410.
- Takei K, Yamaya T, Sakakibara H.** 2004. Arabidopsis *CYP735A1* and *CYP735A2* encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of *trans*-Zeatin. J. Biol. Chem. 279, 41866–41872.
- Tanaka M, Takei K, Kojima M, Sakakibara H, Mori H.** 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. Plant J. 45, 1028–1036.
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong FX, Long JA, Li L, Moreno JE, Bowman ME, Ivans LJ, Cheng YF, Lim J, Zhao YD, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J.** 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. Cell 133, 164–176.
- Tarkowski P, Tarkowská D, Novák O, Mihaljević S, Magnus V, Strnad M, Salopek-Sondi B.** 2006. Cytokinins in the perianth, carpels, and developing fruit of *Helleborus niger* L. J. Exp. Bot. 57, 2237–2247.
- The Tomato Genome Consortium.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. Nature 485, 635–641.
- Tiwari, A., Vivian-Smith, A., Ljung, K., Offringa, R. and Heuvelink, E.** 2013. Physiological and morphological changes during early and later stages of fruit growth in *Capsicum annuum*. Physiol. Plant. 147, 396–406.
- Tiwari, A, Vivian-Smith A, Voorrips RE, Habets MEJ, Xue LB, Offringa R, Heuvelink EP.** 2011. Parthenocarpic potential in *Capsicum annuum* L. is enhanced by carpelloid structures and controlled by a single recessive gene. BMC Plant Biol. 11, 143.
- Van Ieperen W, Volkov VS, Van Meeteren U.** 2003. Distribution of xylem hydraulic resistance in fruiting truss of tomato influenced by water stress. J. Exp. Bot. 54, 317–324.
- van Tuinen A, Kerckhoffs LHJ, Nagatani A, Kendrick RE, Koornneef M.** 1995. A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. Plant Physiol. 108, 939–947.
- Wang H, Jones B, Li ZG, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latché A, Pech JC, Bouzayen M.** 2005. The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. Plant Cell 17, 2676–2692.
- Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latché A, Pech JC, Fernie AR, Bouzayen M.** 2009. Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. Plant Cell 21, 1428–1452.
- Weller JL, Perrotta G, Schreuder MEL, van Tuinen A, Koornneef M, Giuliano G, Kendrick RE.** 2001. Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in

- cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant J.* 25, 427–440.
- Weller, JL, Schreuder MEL, Smith H, Koornneef M, Kendrick RE.** 2000. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. *Plant J.* 24, 345–356.
- Werner T, Köllmer I, Bartrina I, Holst K, Schmülling T.** 2006. New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biol.* 8, 371–381.
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmülling T.** 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* 15, 2532–2550.
- Wollaeger HM, Runkle ES.** 2014. Growth of *Impatiens*, *Petunia*, *Salvia*, and Tomato Seedlings under blue, green, and red light-emitting diodes. *Hortscience* 49, 734–740.
- Wollaeger HM, Runkle ES.** 2015. Growth and acclimation of *impatiens*, *salvia*, *petunia*, and tomato seedlings to blue and red light. *Hortscience* 50, 522–529.
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y.** 2011. Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF *ARABIDOPSIS* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 18518–18523.
- Woodward AW, Bartel B.** 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* 95, 707–735.
- Yamada M, Greenham K, Prigge MJ, Jensen PJ, Estelle M.** 2009. The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiol.* 151, 168–179.
- Yamaguchi S.** 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 225–251.
- Zabadal TJ, Bukovac MJ.** 2006. Effect of CPPU on fruit development of selected seedless and seeded grape cultivars. *HortScience* 41, 154–157.
- Zaharah SS, Singh Z, Symons GM, Reid JB.** 2012. Role of brassinosteroids, ethylene, abscisic acid, and indole-3-acetic acid in mango fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 31, 363–372.
- Zhang J, Lin JE, Harris C, Pereira FCM, Wu F, Blakeslee JJ, Peer WA.** 2016. DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, 11010–11015.
- Zhang J, Peer WA.** 2017. Auxin homeostasis: the DAO of catabolism. *J. Exp. Bot.* 68, 3145–3154.
- Zhao XY, Yu XH, Foo E, Symons GM, Lopez J, Bendehakkalu KT, Xiang J, Weller JL, Liu XM, Reid JB, Lin CT.** 2007. A study of gibberellin homeostasis and cryptochrome-mediated

- blue light inhibition of hypocotyl elongation. *Plant Physiol.* **145**, 106–118.
- Zhao Z, Zhang Y, Liu X, Zhang X, Liu S, Yu X, Ren Y, Zheng X, Zhou K, Jiang L, Guo X, Gai Y, Wu C, Zhai H, Wang H, Wan J.** 2013. A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Dev. Cell.* **27**, 113–122.
- Zheng Z, Guo Y, Novák O, Dai X, Zhao Y, Ljung K, Noel JP, Chory J.** 2013. Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 244–246.
- 大山克己, 古在豊樹, 全昶厚. 2003. 閉鎖型苗生産システムの開発およびその利用. *植物工場学会誌* **15**, 1–10.
- 佐野大樹, 飛川光治, 今西俊介. 2018. ホルクロルフェニユロンの果房当たり 1 回散布による雨除け栽培トマトの放射状裂果の軽減. *園芸学研究* **17**, 87–93.
- 軸丸裕介, 花田篤志, 佐藤深雪, 笠原博幸, 南原英司, 山口信次郎, 神谷勇治. 2007. LC-ESI-MS/MS による植物ホルモンの一斉分析. *植物の生長調節* **42**, 167–175.