

# トマトの種子と果実の生産省力化のための基盤技術開発

2021年1月

武井瞳

トマトの種子と果実の生産省力化のための基盤技術開発

筑波大学大学院  
生命環境科学研究科  
生物圏資源科学専攻  
博士（農学）学位論文

武井 瞳

## 目次

目次	i
図表目次	vii
略語表	x
序論	1
1. トマト生産の現状および育種の齎したメリットとデメリット	2
1-1 トマトの経済的な重要性	2
1-2 トマトの生産の労働負荷とコスト	2
1-2-1 トマト F <sub>1</sub> 種子生産の現状と課題	3
1-2-2 トマト果実生産における受粉作業の現状と課題	3
1-3 栽培化されたトマト <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> の参照ゲノム構築	4
1-4 新規遺伝子同定における野生種と突然変異誘発系統の有用性	5
2. F <sub>1</sub> 種子生産 (F <sub>1</sub> 採種) の省力化に向けた細胞質雄性不稔 (CMS) の利用	5
2-1 CMS を用いた作物の F <sub>1</sub> 採種	5
2-1-1 CMS を用いた作物の F <sub>1</sub> 採種の利点	5
2-1-2 CMS 植物の維持	6
2-1-3 トマトの CMS を用いた F <sub>1</sub> 採種が抱える課題	6
2-2 トマト CMS 実用化に向けた花粉親の課題解決	6
2-2-1 果菜類の CMS を用いた F <sub>1</sub> 採種には <i>Rf</i> 遺伝子が必須	6
2-2-2 CMS トマトとそれに対する <i>Rf</i> 遺伝子	7
2-2-3 <i>Rf</i> 遺伝子を持つ野生種 <i>S. pimpinellifolium</i>	8
2-2-4 <i>Rf</i> 遺伝子を持つ野生種 <i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	9
2-3 トマト CMS 実用化に向けた種子親の課題解決	9
2-3-1 柱頭露出型系統 ‘IL2-5’	9
2-3-2 柱頭露出型系統 ‘品種 B’	10
2-3-3 訪花昆虫の種類	10

2-3-4 雄性不稔植物とハチ .....	10
3. 果実生産の省力化に向けた単為結果品種の作出 .....	11
3-1 単為結果と単為結果性トマト品種 .....	11
3-2 同定された単為結果の原因遺伝子と果実形成のメカニズム .....	11
3-2-1 ジベレリンと単為結果 .....	11
3-2-2 雄性不稔と単為結果 .....	12
3-3 本研究で扱う単為結果変異体 <i>spff</i> .....	13
3-3-1 単為結果する <i>spff</i> 変異体の単離 .....	13
3-3-2 <i>spff</i> 変異体の遺伝子同定 .....	13
4. 本研究の目的と概要 .....	14
4-1 目的 .....	14
4-2 研究の概要 .....	15
5. 図表 .....	16
第 1 章 細胞質雄性不稔を用いた除雄不要な F <sub>1</sub> 採種システムの構築 .....	27
1-1 緒言 .....	27
1-2 材料および方法 .....	28
1-2-1 稔性回復系統 ‘LA1670’ ‘LA1673’ の参照ゲノム構築 .....	28
1-2-1-1 供試植物 .....	28
1-2-1-2 NGS 及び ddRAD シーケンスに用いた DNA の抽出 .....	28
1-2-1-3 PacBio に用いた植物のサンプリング .....	28
1-2-1-4 RNA シーケンスに用いた RNA の抽出 .....	28
1-2-1-5 シーケンスデータに基づく擬似染色体の構築 .....	29
1-2-1-6 アセンブリの完全性の評価 .....	30
1-2-1-7 構築した参照ゲノムの構造の比較 .....	30
1-2-1-8 RNA シーケンスによる遺伝子アノテーション検証 .....	30
1-2-2 細胞質雄性不稔系統の遺伝様式の評価 .....	31

1-2-2-1 CMS 系統の葯の表現型観察 .....	31
1-2-2-1-1 供試植物のサンプリング .....	31
1-2-2-1-2 FAA 固定液による固定 .....	32
1-2-2-1-3 切片作成.....	32
1-2-2-2 F <sub>2</sub> 分離比調査による稔性回復様式の推定.....	33
1-2-2-2-1 供試植物.....	33
1-2-2-2-2 F <sub>2</sub> 分離比の調査 .....	33
1-2-2-3 ddRAD シーケンスのライブラリ調整.....	34
1-2-3 柱頭露出型 CMS 系統の作出とハチによる採種システムの評価 .....	35
1-2-3-1 供試植物 .....	35
1-2-3-2 各植物体の <i>style2.1</i> 遺伝型の確認 .....	35
1-2-3-2-1 DNA マーカーの作成.....	35
1-2-3-2-2 ゲノム抽出 .....	35
1-2-3-2-3 <i>style2.1</i> の遺伝型確認のための PCR 条件.....	36
1-2-3-2-4 電気泳動.....	36
1-2-3-3 ハチによる F <sub>1</sub> 採種システムの効率調査 .....	37
1-2-3-3-1 ハチによる訪花の有無の検証.....	37
1-2-3-3-2 ハチと人為による採種効率の比較 .....	37
1-3 結果および考察 .....	37
1-3-1 稔性回復系統 ‘LA1670’ ‘LA1673’ の参照ゲノム構築 .....	37
1-3-1-1 ‘LA1670’ の参照ゲノム構築.....	37
1-3-1-2 ‘LA1673’ の参照ゲノム構築.....	38
1-3-1-3 アセンブリの完全性の評価.....	39
1-3-1-3-1 構築した参照ゲノムの構造比較.....	39
1-3-1-3-2 BUSCO による参照ゲノムの完成度の評価.....	39
1-3-1-4 発現遺伝子分析 .....	40
1-3-1-5 組織特異的な発現遺伝子同定 .....	40
1-3-1-5-1 ‘LA1670’ の組織特異的な発現遺伝子解析 .....	40
1-3-1-5-2 ‘LA1673’ の組織特異的な発現遺伝子解析 .....	41

1-3-2 細胞質雄性不稔系統の遺伝様式の評価.....	42
1-3-2-1 F <sub>2</sub> 分離比調査による稔性回復様式の推定.....	42
1-3-2-2 CMS 系統の葯の表現型観察.....	42
1-3-2-3 交雑 F <sub>2</sub> 集団の ddRAD シーケンスによる 'LA1670' の Rf 遺伝子座乗領域の推定.....	43
1-3-3 柱頭露出型 CMS 系統の作出とハチによる採種システムの評価.....	44
1-3-3-1 'IL2-5' の利用による柱頭露出型 CMS 系統の作出.....	44
1-3-3-1-1 柱頭露出型 CMS 系統の作出.....	44
1-3-3-1-2 非柱頭露出型 CMS 系統の作出.....	44
1-3-3-1-3 CMS 系統における <i>style2.1</i> の遺伝子型ごとの表現型観察.....	45
1-3-3-1-4 <i>style2.1</i> 変異の顕性/半顕性の調査.....	45
1-3-3-2 '品種 B' の利用による柱頭露出型 CMS 系統の作出.....	46
1-3-3-3 ハチによる採種可能性の検証 (予備実験).....	46
1-3-3-4 ハチによる採種効率の検証 (本実験).....	46
1-3-3-4-1 非柱頭露出型 CMS 系統の採種試験結果.....	46
1-3-3-4-2 柱頭露出型 CMS 系統の採種試験結果.....	47
1-3-3-4-3 採種コストの算出と比較.....	48
1-3-4 第 1 章の結果のまとめ.....	49
1-3-5 第 1 章の考察.....	50
1-4 図表.....	54
第 2 章 マイクロトムにおける新規単為結果原因遺伝子の同定.....	96
2-1 緒言.....	96
2-2 材料および方法.....	96
2-2-1 植物材料と成長条件.....	96
2-2-2 <i>spff</i> 変異体の表現型観察.....	97
2-2-2-1 子房細胞の切片観察.....	97
2-2-2-1-1 サンプリングおよび脱気.....	97
2-2-2-1-2 パラフィン置換と包埋.....	97

2-2-2-1-3 切片の作成.....	98
2-2-2-1-4 トルイジンブルー染色.....	98
2-2-2-1-5 顕微鏡観察.....	99
2-2-2-2 発芽率の調査.....	99
2-2-2-3 収量の調査.....	99
2-2-3 単為結果原因遺伝子の同定.....	99
2-2-3-1 品種間多型を用いた連鎖解析による <i>SPFF</i> 遺伝子座の絞り込み.....	99
2-2-3-1-1 PCR 条件.....	100
2-2-3-1-2 制限酵素処理.....	100
2-2-3-1-3 電気泳動.....	100
2-2-3-2 NGS 解析で同定された原因遺伝子候補の連鎖解析.....	101
2-2-3-2-1 $BC_2F_2$ , $BC_3F_2$ , $BC_4F_2$ 個体からの DNA の抽出.....	101
2-2-3-2-2 PCR および配列の解説.....	102
2-2-3-3 <i>SPFF</i> 遺伝子コンストラクト構築と遺伝子導入.....	102
2-2-4 同定遺伝子による単為結果メカニズムの解明.....	103
2-2-4-1 RNA シーケンス解析.....	103
2-2-4-2 RNAi 形質転換体のリアルタイム PCR による発現分析.....	103
2-2-4-3 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーションによる発現解析.....	104
2-2-4-3-1 サンプルングおよびサンプル固定.....	104
2-2-4-3-2 RNA プローブ作成.....	105
2-2-4-3-2-1 テンプレート作成.....	105
2-2-4-3-2-2 RNA プローブの合成.....	105
2-2-4-3-3 ドットプロットを用いたプローブ濃度の確認.....	106
2-2-4-3-4 <i>in situ</i> hybridization.....	106
2-2-4-4 サフラニン-アストラブルー二重染色.....	108
2-3 結果および考察.....	108
2-3-1 <i>spff</i> 変異体の特徴付け.....	108
2-3-1-1 果実の測定.....	108
2-3-1-2 子房切片の観察.....	109

2-3-1-3 生殖器官の観察 .....	109
2-3-1-4 収量の調査.....	109
2-3-1-5 草姿および栄養器官の観察.....	110
<b>2-3-2 SPFF 遺伝子の同定 .....</b>	<b>110</b>
2-3-2-1 連鎖解析による SPFF 候補遺伝子の絞り込み .....	110
2-3-2-2 候補遺伝子 <i>Solyc04g077010</i> の選出 .....	111
2-3-2-3 RNA サイレンシング (RNAi) による SPFF 遺伝子の同定 .....	111
<b>2-3-3 <i>spff</i> 変異による単為結果メカニズムの解明 .....</b>	<b>112</b>
2-3-3-1 SPFF 遺伝子の発現パターンの特徴付け .....	112
<b>2-3-3-1-1 既存のデータベースによる特徴付け.....</b>	<b>112</b>
<b>2-3-3-1-2 <i>in situ</i> hybridization 法による空間的な発現解析.....</b>	<b>112</b>
2-3-3-2 <i>spff</i> 変異がもたらす転写レベルの影響解明 .....	112
<b>2-3-3-2-1 <i>in situ</i> hybridization 法およびリアルタイム PCR による SPFF 遺伝子の転写レ</b>	<b>ベルの解明.....</b>
<b>2-3-3-2-2 RNA シーケンスによる子房の転写産物の網羅的解析 .....</b>	<b>113</b>
2-3-3-3 相同遺伝子の探索および相同遺伝子の変異体との表現型比較.....	113
<b>2-3-3-3-1 BLAST を用いた相同遺伝子の探索 .....</b>	<b>113</b>
<b>2-3-3-3-2 相同遺伝子の機能欠損体と <i>spff</i> 変異体の表現型比較.....</b>	<b>114</b>
2-3-4 第 2 章の結果のまとめ.....	114
2-3-5 第 2 章の考察 .....	115
<b>2-4 図表 .....</b>	<b>118</b>
<b>総合考察 .....</b>	<b>135</b>
<b>摘要.....</b>	<b>145</b>
<b>謝辞.....</b>	<b>148</b>
<b>引用文献 .....</b>	<b>150</b>



## 図表目次

### 序論

表 1. F<sub>1</sub> 植物を自殖して得た F<sub>2</sub> 集団における *spff* 変異型個体の分離試験結果

表 2. *spff* 変異体型の個体に存在しアミノ酸の変化を伴う 77 個の変異

表 3. NGS により絞り込まれた領域内で変異を持つ 46 個の候補遺伝子

図 1. 本研究で使用した稔性回復系統が採集された地理的位置

図 2. 植物ホルモンが着果を誘導する機構

図 3. *spff* 変異体の果実と花

図 4. F<sub>2</sub> 集団で野生型を示す個体と *spff* 変異体型を示す個体の初花の開花日

図 5. SNP マーカーの対立遺伝子頻度

### 第 1 章

表 1-1. 第 1 章に用いたソフトウェアの一覧

表 1-2. 葯サンプリング前の 12 日間の気温と日照時間

表 1-3. 組織固定時の脱気サイクル

表 1-4. 組織固定に用いた溶液

表 1-5. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ より得られたシーケンスデータの統計

表 1-6. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ より得られたシーケンスデータの統計

表 1-7. 修正前のコンティグ統計

表 1-8. 修正後のコンティグ統計

表 1-9. 擬似染色体スキュフォールドの統計

表 1-10. 擬似染色体の構成

表 1-11. 構築した参照ゲノムの包含する緑色植物のコアジーンセットの割合

表 1-12. 構築した参照ゲノムの包含する陸上植物のコアジーンセットの割合

表 1-13. 構築した参照ゲノムの包含する真正双子葉類のコアジーンセットの割合

表 1-14. 組織別の RNA シーケンスにより得られたデータ量

表 1-15. RNA シーケンスにより得られたリードの器官別の参照配列へのマップ率

表 1-16. 発現が確認された遺伝子数

表 1-17. 果実で発現の観察されなかった遺伝子数

表 1-18. 葯あるいは花粉のみ発現の観察された遺伝子数

表 1-19. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の *Rf* 遺伝子座として同定された領域内で雄性器官に発現のある遺伝子のリスト

表 1-20. 非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ の採種効率調査結果

表 1-21. 非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’ の採種効率調査結果

表 1-22. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ の採種効率調査結果

表 1-23. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’ の採種効率調査結果

図 1-1. 本研究に供試した稔性回復系統の表現型

図 1-2. 参照ゲノム構築のフローチャート模式図

図 1-3. 構築した 2 系統のゲノムと *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz1706’ (SL4.0) のドットプロット比較

図 1-4. *S. lycopersicum cerasiforme* の第一アセンブルコンティグと *S. l. lycopersicum* のドットプロット比較

図 1-5. 種子をつけない個体の受粉 1 日後の柱頭のアニリンブルー染色

図 1-6. ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ と維持系統 ‘品種 A’ の葯組織の横断面の比較.

図 1-7. F<sub>2</sub> 集団全個体の ddRAD シーケンスから得られた SLL 型のアレル頻度

図 1-8. 非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ の雌蕊と雄蕊

図 1-9. ‘M82’ および ‘IL2-5’ との交配により作出した CMS 系統との雌蕊と雄蕊

図 1-10. ‘M82’ と ‘IL2-5’ の交配により作出した F<sub>1</sub> 植物の雌蕊と雄蕊

図 1-11. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ の雌蕊と雄蕊

図 1-12. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC1’ のクロマルハナバチのバイトマーク

図 1-13. ハチによる交配と手交配における 1 株あたりの F<sub>1</sub> 採種数

## 第 2 章

表 2-1. 遺伝子型の決定に用いた個体の世代と表現型

表 2-2. 第 2 章 に用いたプライマーの一覧

表 2-3. 候補遺伝子変異と表現型の連鎖解析結果

表 2-4. *spff* 変異体と ‘Micro-Tom’ 野生株の未受粉の雌蕊において発現量が異なる遺伝子のリスト

図 2-1 ‘Micro-Tom’ 野生株による *spff* 変異体の戻し交配個体の作出

- 図 2-2. *spff* 変異体の果実の表現型観察結果
- 図 2-3. ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の子房壁の組織断面
- 図 2-4. *spff* 変異体の生殖器官の表現型
- 図 2-5. *spff* 変異体の収量評価
- 図 2-6. ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の脇芽の枝分かれ形態の比較
- 図 2-7. *Solyc04g077010* の遺伝子構造
- 図 2-8. 形質転換により作出された RNAi による *Solyc04g077010* 発現抑制系統とその表現型
- 図 2-9. トマトの器官, 組織, 細胞における *SPFF* の発現パターン
- 図 2-10. 発達中の蕾における *Solyc04g077010* 転写産物の発現分布 (*in situ* ハイブリダイゼーション)
- 図 2-11. *spff* 変異体における *Solyc04g077010* の mRNA の発現抑制
- 図 2-12. *spff* 変異体の花托における維管束の組織横断面切片

## 略語表

a	Are (アール)
BLAST	Basic local alignment search tool
bp	Base pairs
BUSCO	Benchmarking universal single-copy orthologs
cDNA	Complementary DNA
CMS	Cytoplasmic male sterility
ddRAD	Double digest restriction site associated DNA sequence
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMS	Ethyl methanesulfonate
EtOH	Ethanol
F <sub>1</sub>	First filial generation
F <sub>2</sub>	Second filial generation
FAA	Formalin-acetic acid-alcohol
<i>GA20ox</i>	<i>GIBBERELLIN 20-OXIDASE</i>
<i>GA2ox</i>	<i>GIBBERELLIN 2-OXIDASE</i>
GABA	Gamma-aminobutyric acid
GATK	Genome analysis toolkit
Gb	Giga base pairs = 1,000,000,000 bp
gDNA	Genomic DNA
ha	Hectare (ヘクタール)
IL	Introgression line
Indel	insertion/deletion
INRA	Institut National de la recherche agronomique
Iso-Seq	Isoform-sequencing
kb	Kilo base pairs = 1,000 bp
kg	Kilogram
M	Molar concentration, mol/dm <sup>3</sup>
Mb	Mega base pairs = 1,000,000 bp

MPa	Mega pascal
mRNA	Messenger RNA
NBRP	National bioresource project
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Paired end
PPR	Pentatricopeptide repeat protein
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
rcf	Relative centrifugal force
Rf	Restorer of fertility
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RPKM	Reads per kilobase of exon per million mapped reads
rpm	Rotations per minute / Revolutions per minute
RT-PCR	Reverse transcription PCR
SLC	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>
SLL	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i>
SNP	Single nucleotide polymorphism
SP	<i>Solanum pimpinellifolium</i>
<i>spff</i>	<i>small parthenocarpic fruit and flower</i>
SV	Structural variance
t	Tonne
TAE	Tris-acetate-EDTA
T-PIRC	Tsukuba-plant innovation research center
TPM	Transcripts per million
UV	Ultraviolet
var.	Variety
WT	Wild type

# 序論

## 序論

### 1. トマト生産の現状および育種の齎したメリットとデメリット

#### 1-1 トマトの経済的な重要性

トマトは、栄養価が高く、世界で最も食されている作物の一つである。国際連合食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) の統計によると、2018年のトマトの生産量は175カ国で報告があり、その栽培面積の合計は4,762,457 ha、総生産量は1億8225万トンである (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020 (参照 2020-09-17))。また、2018年の世界のトマト市場規模 (小売マーケティングコストを除く生産者と輸入者の合計収益) は、前年比6.5%増の1,904億ドルであった。トマトの市場価値は2007年から2018年にかけて平均年率+3.1%で増加しており、今後市場の成長の維持が予想されている (IndexBox, 2019 (参照 2020-09-17))。

日本においては、トマトはイネに次いで2番目に農業産出額の高い作物である。平成30年度の全国のトマトの作付面積は11,800 haで、10 haあたりの収量は6,140 kg、収穫量は724,200 tである (農林水産省, 2019)。日本ではビニールハウスやガラス温室などの施設を利用した施設栽培の普及により、一般的に夏秋トマト (7月~11月) と冬春トマト (12月~6月) に区分された周年での生産が行われている。

#### 1-2 トマトの生産の労働負荷とコスト

農林水産省の品目別経営統計によると、日本のトマトの生産にかかる農業経営費は10 aあたり137万円であり、労働時間は10 aあたり983時間と算出されている (農林水産省, 2007)。平成17年度産トマトの農業経営費のうち、種苗にかかる経営支出は、10 aのトマト生産あたり、夏秋トマトで9万9千円 (農業経営費総額の9.6%)、冬春トマトで8万2千円 (農業経営費総額の4.9%) と試算されている。また、同統計によると、10 aあたりのトマト生産の労働時間のうち、収穫・調整に次いで2番目に大きな割合を占めているのが、受粉作業、脇芽とりといったトマト栽培に関わる日々の労働が含まれる栽培管理費であり、夏秋トマト、冬春トマトでそれぞれ総労働時間の29.3%、33.6%を占めている。

### 1-2-1 トマト F<sub>1</sub> 種子生産の現状と課題

トマトの種子は、異なる親品種を掛け合わせて得られる雑種一代目 (First filial generation (F<sub>1</sub>)) が主に販売されている (篠原, 2014). 雑種一代目の植物は、雑種強勢によってそれぞれの親品種よりも収量性や生物/非生物ストレスへの耐性が優れ、大きさや形状、収穫時期が揃うことが知られている (Stuber 1994, Georgiev 1991). また、F<sub>1</sub> 種子を自殖した際には相同染色体上の組換えが起こるため、得られる F<sub>2</sub> 集団は果実形質や収穫時期にばらつきが生じる。農家は優良な形質を伴い品質の一定な F<sub>1</sub> 種子を自家採種できないため、親や交雑の組み合わせを公表しない限り、種苗会社に栽培周期ごとの収益をもたらす。これら農家にとっての実用面、種苗会社にとっての経済面での優位性が、F<sub>1</sub> 種子がトマト種苗の市場を占める主な要因である。

作物の F<sub>1</sub> 種子生産において重要なのが、種子親の自殖種子の混入の防止である。種子親の自殖種子の混入は、種苗会社にとって重要な親品種の流出に繋がる。加えて、種子親の自殖種子が F<sub>1</sub> 種子に混入した場合は、F<sub>1</sub> 種子に求められる商品の均一性 (F<sub>1</sub> 種子に自殖種子の混入がないこと) が損なわれるため市場価値が低下する。そのため、F<sub>1</sub> 種子の採種現場では、蒴が成熟する前の種子親の蕾からピンセットで蒴を取り除く作業を行い、自殖種子の混入を防いでいる (Ozores-Hampton M., 2014). 商用に F<sub>1</sub> 種子を生産する国内企業において、この作業を担っているのが諸外国の採種会社や採種農家である (浜崎ら, 2015). 種子の生産に必要な隔離された場所と広い作付面積の確保が国内では難しいことや、天候不順による不作のリスクを避けるため、東南アジア諸国連合 (Association of South - East Asian Nations, ASEAN) を始めとした新興国や、南ヨーロッパや南米といった気候の良い地域に委託し F<sub>1</sub> 種子の生産を行ってきた。しかし経済発展に伴う人件費の高騰や、地球規模での採種適地の減少により、採種コストが 10 年間でおよそ 3 倍になった (農林水産先端技術産業振興センター, 2009). また、諸外国の競合する種苗会社への親品種の流出のリスクも課題となっている。

### 1-2-2 トマト果実生産における受粉作業の現状と課題

通常、トマトが果実をつけるためには受粉と受精が不可欠である。トマトの花粉は温度や湿度の条件が整わない環境では容易に稔性を失い、雌蕊の柱頭も湿度が低い場合には受粉効率が低下するため、環境条件に左右されずに安定して果実生産を行うため



に受粉作業は欠かせない作業の一つである (Dinar and Rudich 1985, Teasdale and Abdulbaki 1995).

トマトの受粉作業は大きく分けて2つの方法がある。バイブレーターを用いてトマトの花房を振動させ葯の開裂と花粉の飛散を促す振動受粉処理と、訪花昆虫であるクロマルハナバチ (*Bombus ignitus*) を用いて受粉させる方法である。振動受粉処理は花房毎に振動処理を行う必要があり、特に酷暑下での労働負担が大きいという課題がある。農家は代替案としてジベレリンを含む着果促進剤を噴霧するホルモン剤処理を行うこともあるが、夏秋トマトで週に2回、冬春トマトで週1回、ホルモン剤を噴霧する必要があり、こちらも労働負担が大きいという課題がある。また、ホルモン剤処理の作業経費は10 aあたり年間およそ15万円とされ、金銭的な負担も小さくない。一方、人為による受粉作業の代替案としてクロマルハナバチを用いる場合、その飼養経費は10 aあたり年間14万円であり、加えて、温室内の気温をマルハナバチの活動温度帯(後述)に調節するための冷暖房費と、マルハナバチの逃亡防止用ネットの設備費が必要である(農林水産省, 2007)。これらがトマト生産における受粉コストであるといえる。

### 1-3 栽培化されたトマト *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* の参照ゲノム構築

現在、食用トマトとして栽培されている種は *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* と表記される栽培種である。*S. l. lycopersicum* は南米に起源を持ち、ペルーとエクアドルの両方で栽培化と品質の改良が行われてきたとされている (Mata-Nicolás et al., 2020, Razifard et al., 2020)。その結果、トマトは、ビタミン、ミネラル、食物繊維の豊富な供給源として、また、抗酸化物質の食餌源として、現在では世界的に栽培されている最も重要な野菜作物の一つとなった (Passam et al., 2007, Salehi et al., 2019)。*S. l. lycopersicum* ‘Heinz 1706’のゲノム配列情報および遺伝子アノテーション情報は、2012年に国際トマトコンソーシアム (Tomato Genome Consortium) によって解読されて以来、複数回の改良・高品質化を経て、現在はロングリードシーケンサーと染色体立体配座捕捉法 (Hi-C法) の技術を用いて再構築された参照配列バージョン SL4.0 と遺伝子アノテーション情報 ITAG4.0 がトマトゲノムコンソーシアムのホームページから公開されている (The Tomato Genome Consortium 2012, Hosmani et al., 2019)。これらの最新の情報によると、トマトゲノムはゲノム長が 782.5 Mb であり、染色体数は 12 本、遺伝子数は 34,075 個、である。*S. l. lycopersicum* は果菜類のモデル作物として、構築された参照ゲノム情報を用い

て、単為結果をはじめ、果皮色、糖代謝、あるいは  $\gamma$ -アミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid, GABA) などに関する様々な遺伝子が同定され、トマト研究の基盤が構築されてきた (Bollier et al., 2018, Mubarak et al., 2019, Safaei et al., 2020).

#### 1-4 新規遺伝子同定における野生種と突然変異誘発系統の有用性

一方で、トマト育種の過程で失われてきた形質とその原因遺伝子に近年、着目が集まっている。栽培に不向きな形質をもたらす遺伝子や、食味の低下に関わる遺伝子、あるいは収穫後の果実の保存性を低下させる遺伝子は、野生種トマトの栽培化と改良育種の過程の人為的な選択によりおのずと失われた (Liu et al., 2020, Fernie et al., 2019). *S. l. lycopersicum* が持たないそれらの形質を向上する遺伝子 (ゲノム領域) はしばしば野生種トマトに存在することが知られており、野生種トマトのゲノム解読は新規の形質をもたらす遺伝子の同定に繋がる。人為的な選択により *S. l. lycopersicum* で失われた遺伝子のみならず、雌蕊や雄蕊の不稔をもたらす遺伝子や、生殖に不利に働く遺伝子も自然選択のなかで必然的に淘汰された。果実や種子の稔性に関わる遺伝子の同定は、果実発達や生殖過程の解明に寄与することから、植物の生殖研究の隆盛とともに重要性が増している。トマトのナショナルバイオリソースプロジェクト (National BioResource Project, NBRP) は、アルキル化剤であるエチルメタンサルホネート (Ethyl Methanesulfonate, EMS) や放射線の一種であるガンマー線を用いてランダムに遺伝子変異を誘発した変異体集団 (EMS 処理由来変異体 1479 系統、ガンマー線照射由来変異体 164 系統 (2013 年 11 月現在)) を保有しており、これらの変異体の解析は、自然界で淘汰され易い形質を引き起こす遺伝子の同定や機能解明に重要な役割を持つ (Saito et al., 2011).

## 2. $F_1$ 種子生産 ( $F_1$ 採種) の省力化に向けた細胞質雄性不稔 (CMS) の利用

### 2-1 CMS を用いた作物の $F_1$ 採種

#### 2-1-1 CMS を用いた作物の $F_1$ 採種の利点

細胞質雄性不稔 (Cytoplasmic male sterility, CMS) は、核と細胞質の遺伝子産物の不親和により正常な (稔性のある) 花粉が産生されない現象である。この不親和はミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質が原因で生じ、母性遺伝する雄性不稔である。CMS 植物は雄性不稔により自殖種子を得られないことから、 $F_1$  種子への自殖種子の混

入を未然に防ぐことができる。そのため、CMS は  $F_1$  種子生産における種子親の形質としてイネ、トウモロコシ、テンサイ、ナタネ等の作物で利用されてきた (Havey 2004)。 $F_1$  種子生産から種子親の除雄作業を省略しコストを削減できることに加え、CMS を種子親に用いることは採種委託先の諸外国における親品種の自家採種を防止できる利点もある。

### 2-1-2 CMS 植物の維持

CMS 植物を種子親として用いる場合、CMS 植物は雄性不稔により自殖種子を得ることができないため、CMS 植物を維持するために稔性が正常な系統での維持が必要である。CMS 植物を継代し維持するために用いる系統を維持系統といい、世代を重ねるごとに、核ゲノムが維持系統に置換される。

### 2-1-3 トマトの CMS を用いた $F_1$ 採種が抱える課題

トマトにおいては、CMS を持つ 3 系統のトマト ‘CMS[MSA]’ ‘CMS[MSB]’ ‘CMS[MSC]’ が、トマトとジャガイモの非対称性細胞融合により作出されている (Melchers et al., 1992)。CMS トマトの細胞質に由来する雄性不稔性を  $F_1$  種子生産の種子親に活用することができれば、除雄の要らない  $F_1$  採種が実現する可能性がある。しかし現在、CMS トマトを種子親として用いた  $F_1$  採種システムは実用化されていない。CMS トマトの実用化には、花粉親と種子親にそれぞれ存在する課題を解決する必要がある。花粉親の抱える課題は、果菜類の CMS 系統を用いた  $F_1$  採種において花粉親が持つべき稔性回復遺伝子 (後述) が同定されていないことである。種子親が抱える課題は、トマトの花の構造上、柱頭を葯が覆っているために、他殖種子を得る効率が著しく低いことである。以下の節 2-2, 2-3 ではそのそれぞれについて説明する。

## 2-2 トマト CMS 実用化に向けた花粉親の課題解決

### 2-2-1 果菜類の CMS を用いた $F_1$ 採種には *Rf* 遺伝子が必須

CMS は  $F_1$  採種を効率化することができるが、果菜類の  $F_1$  採種においては CMS の稔性を回復できる 稔性回復 (*Restorer of Fertility, Rf*) 遺伝子が必須である (Bohra et al., 2016)。CMS の原因である因子は細胞質ゲノムにコードされているため、*Rf* 遺伝子を持たない系統を花粉親として得た  $F_1$  植物には、CMS の形質が母性遺伝している。そのため、 $F_1$  植物の

花粉は不稔となり、自家受粉が出来ないことが原因で着果しないという問題が生じ、F<sub>1</sub>種子が商品価値を持たない。一方、CMSの稔性を回復できるRf遺伝子を持つ系統を花粉親、CMS系統を種子親として得られるF<sub>1</sub>植物では、Rf遺伝子がCMSの原因因子の作用を打ち消すことによって、花粉の稔性が回復する。そのため、F<sub>1</sub>植物の自殖が可能となり、果実を生産できるF<sub>1</sub>品種として種子が商品価値を持つことができる。果菜類の他に、穀物の採種の際にもCMSを打ち消すRf遺伝子が必要であり、Rf遺伝子の同定はこれまで、イネ、トウモロコシ、テンサイなどで先行研究が行われてきた。

核にコードされるRf遺伝子は、ミトコンドリアにコードされるCMS誘導タンパク質の蓄積量の減少をもたらすなどしてCMS植物の稔性を回復させるが、そのメカニズムは未解明な部分も多い。また、様々な植物種から同定されたRf遺伝子の大部分はペンタトリコペプチドリピートファミリー (pentatricopeptide repeat protein family, PPR) に属するタンパク質をコードしている。PPRタンパク質は、35基のアミノ酸のモチーフの繰り返し構造を特徴としており、一本鎖RNAと結合できるドメインを持つ。例えば、ミトコンドリア由来の雄性不稔関連遺伝子のRNAと結合し、プロセッシングや転写に影響することで、雄性不稔を引き起こすタンパク質の転写あるいは翻訳を抑制する働きを持つ。シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシからRf遺伝子として同定されたPPRは、ミトコンドリア遺伝子の転写、RNAの安定化、5'及び3'のRNA切断、イントロンスプライシング、RNA編集、mRNA翻訳、といったRNAプロセッシング及び発現に関わる工程に関与することが示されている (Dahan and Mireau, 2013)。

### 2-2-2 CMS トマトとそれに対する Rf 遺伝子

トマトにおいては非対称性細胞融合による CMS 系統 'MSA1' が作出されているが (Melchers et al., 1992), その稔性を回復させる Rf 遺伝子は未だ同定されていない。先行研究では、野生種トマトおよび近縁野生種の *S. pimpinellifolium* 'LA1670', *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673', *S. cheesmaniae* 'LA166', *S. esculentum* 'MN1-5', が Rf 遺伝子を保有する可能性が示唆されていた。また、*S. pimpinellifolium* 'LA1670' は顕性の一遺伝子座に支配される Rf 遺伝子を保有することが報告されている (特開平 9-28223)。しかし、Rf 遺伝子の座乗領域は未知であるために、花粉親品種への Rf 遺伝子の導入が難しく、

CMS を用いた効率的な F<sub>1</sub> 採種システムが実用化されていない。現在、Rf 遺伝子の同定およびそのマーカー化が求められている。

### 2-2-3 Rf 遺伝子を持つ野生種 *S. pimpinellifolium*

野生のトマト種である *S. pimpinellifolium* は多年生低木であり、その原産地や移動地 (エクアドルやペルーなど) の地理的・気候的な品種が豊富である (Moyle 2008, Lin et al., 2019, Blanca et al., 2012, Zuriaga et al., 2009)。そのため、例えば アクセション ‘LA0480’ と ‘LA1670’ はトマト黄化葉巻病ウイルス (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) に対して、栽培種と同程度に抵抗性がほぼないが、‘LA1589’ は TYLCV に対して弱い抵抗性を示すなど、アクセション番号ごとに異なる表現型とゲノムの多様性を有することが知られている (Johansen et al., 2019, Yan et al., 2018)。

参照ゲノム構築において、‘LA1589’ は *S. pimpinellifolium* の最初のドラフトゲノムを構築するために使用され (Tomato Genome Consortium, 2012)、その後 ‘LA0480’ においても参照ゲノムが構築された。しかし、前者は 100 bp のペアエンド (paired end, PE) ライブラリーからただアセンブリされた十数万から成るコンティグであり、ゲノム情報はかなり断片化されている。後者は 101 bp の PE ショートリードライブラリーと 5 種類の 100 bp のメイトペアライブラリー (インサートサイズ=2, 6, 8, 10, >10 kb) を用いてゲノムアセンブリされたが、ゲノム情報が断片化された不完全なものであった (Razali et al., 2018)。  
‘LA2093’ は一分子シーケンサーである PacBio のロングリードと Hi-C を用いて染色体の空間的な位置情報を含んだゲノム配列が読み取られた。スキュフォールド長は大幅な改善し、遺伝子数 (35,761 遺伝子) も栽培品種に近い精度で予測された。加えて、データベースに公開されているオレンジステージの果実のトランスクリプトームデータを用いて遺伝子アノテーション情報の検証が行われ、その 99.4% に当たる遺伝子の発現を確認している (Wang et al., 2020)。

近年、単一の個体のみではなく、その種や集団全体で保存されたゲノムのコア領域 (コア遺伝子セットを含む) を明らかにする pan-genome 解析も進み、加えて、ロングリードシーケンサーである Nanopore を利用して *S. pimpinellifolium* の 21 のアクセションについてゲノムが解読され、*S. pimpinellifolium* のゲノムにおいて構造変異 (Structural Variance, SV) に富んだ領域が同定されている。興味深いことに、SV 領域が

収量や花の形態といった形質に関与する遺伝子の発現量に関与することも明らかになってきた(Alonge et al., 2020, Gao et al., 2019).

これまでにゲノムが解読された ‘LA1589’, ‘LA0480’, ‘LA2093’ および pan-genome 研究により解読された *S. pimpinellifolium* の 21 のアクセッションが *Rf* 遺伝子を持つかどうかは先行研究では明らかにされていなかった. 一方, *Rf* 遺伝子の保有が示唆された ‘LA1670’ はゲノムが解読されていなかった. ‘LA1670’ を用いた先行研究は僅少で, ペルーのタクナで採集されたということと, TYLCV に対して栽培種と同程度に抵抗性がないこと, 耐暑性を持たないことが報告されているに留まった (図 1) (Egashira et al., 2000, Yan et al., 2018, Driedonks 2018).

#### 2-2-4 *Rf* 遺伝子を持つ野生種 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*

*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* は, *S. pimpinellifolium* に由来する種であり, 栽培種である *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* と最も最近の共通祖先として *S. pimpinellifolium* を共有している (Blanca et al., 2012). 上述の pan-genome 解析では 23 系統の *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* のゲノムが解読され, うち 15 のアクセッションのゲノムシーケンスの塩基配列情報が利用可能である (Alonge et al., 2020). 一方, *Rf* 遺伝子の保有が示唆されたアクセッション ‘LA1673’ はペルーのリマで採集された系統で, 耐塩性があり, 栽培品種と比較してトマトの風味に関連する糖分, 有機酸, 揮発性物質が多いことが知られていたが, そのゲノムは解読されていなかった (図 1) (Hassan, 2010, Goff and Klee, 2006).

### 2-3 トマト CMS 実用化に向けた種子親の課題解決

#### 2-3-1 柱頭露出型系統 ‘IL2-5’

種子親が抱える課題は, トマトの花の構造上, 葯が筒状に柱頭を囲い覆っているために, 他殖種子を得る効率が著しく低いことである. 一方, ダイコン (*Raphanus sativus* L.) では, 柱頭の露出する系統は, そうでない系統と比較して, 自殖種子の産生率が低く, 他殖種子の産生率が高いことが示されていた (Kobayashi et al., 2006). このことから, トマトにおいても, 種子親の柱頭露出が  $F_1$  採種効率を向上させるのではないかと考えた. トマトの柱頭露出型系統 ‘IL2-5’ は, 栽培品種 ‘M82’ の第 2 染色体の一部が *S. Pennellii* で置換された染色体断片置換系統 (Introgression Line, IL) であり, 花柱を伸ば

す顕性変異 *style2.1* を持つことが知られていた (Eshed, Y. and D. Zamir. 1995, Kai-Yi Chen et al., 2007) ‘IL2-5’ は *L02* 遺伝子の 10,120 bp 上流 (5’側) に存在する *style2.1* 遺伝子座の 450 bp, 750 bp の挿入 (*style2.1*) による。*L02* 遺伝子は *in silico* の構造予測により、4 番目のアミノ酸から 60 番目のアミノ酸にかけて beta-Helix-loop-helix (bHLH) モチーフを有することが分かっていた。また、遺伝子発現を恒常的に誘導する 35S プロモーターを用いてトマトで過剰発現させると雌蕊が伸長することがわかっている。そのため、細胞伸長に寄与すると考えられるが、詳細な機能は未知であった。

### 2-3-2 柱頭露出型系統 ‘品種 B’

民間の種苗会社が保有する親系統の実用品種 ‘品種 B’ は柱頭が露出する形質を持つ (未発表)。*‘品種 B’* を用いて得られる  $F_1$  品種では柱頭が葯に覆われた形質を持つことから、柱頭露出の形質は潜性の遺伝子に支配されていることが示唆されていた。しかし、柱頭露出をもたらす遺伝子や遺伝子座は同定されていなかった。

### 2-3-3 訪花昆虫の種類

作物栽培の受粉に農業利用される訪花昆虫は、ミツバチ、マルハナバチ、ヒロズキンバエ、シマハナアブが知られている (水野, 2008)。トマトに利用されているマルハナバチの種類はセイヨウオオクロマルハナバチとクロマルハナバチである。マルハナバチの優れた受粉媒介能力が農業生産に貢献していることは「種の起源」の著者チャールズ・ダーウィンも指摘している (浅田ら, 2001)。マルハナバチはミツバチに比べてナス科への訪花性が高い、振動受粉が可能、並びに活動温度幅が広いという特徴がある。ミツバチの活動温度は約 18°C~25°C (活動温度幅 8°C) であるのに対して、マルハナバチの活動温度は約 15°C~28°C (活動温度幅 14°C) である。マルハナバチは花の蜜を吸い、後ろ足にある花粉籠に花粉を集める特徴がある。葯に噛み付いて花にぶら下がり、胸の筋肉を動かすことで、花をゆすって花粉を落とし、落とした花粉を腹で受けて集める。その際に体毛についた花粉が植物を受粉する (小出, 2007)

### 2-3-4 雄性不稔植物とハチ

先行研究では、花粉を産生しないニンジンやダイコンの CMS 系統にはハチの訪花が減少することが示されていた (Gaffney et al. 2019, Erickson 1983)。また、トマト生産にお

いても、冬期（1月）に花粉の生成が著しく低下し、花粉粒の変形や不稔を伴った場合には、マルハナバチが受粉行動を示さなくなったという報告がなされている（浅田ら、2001）。その原因の仮説として、花粉生成量の低い花をマルハナバチが訪花対象として不適と判断し、他の訪花対象を探し求めたことが原因であることが示唆されていた。

### 3. 果実生産の省力化に向けた単為結果品種の作出

#### 3-1 単為結果と単為結果性トマト品種

トマト生産から受粉作業を省略できれば、生産の省力化とコストの低減に繋がる。一方、受粉/受精なしで果実を形成する性質を単為結果という。単為結果性は国内で生産されるキュウリ品種に広く導入されており、ナスにおいても単為結果性品種‘あのみりのり’が生産現場で利用されている（農林水産省、2020）。単為結果性を持つトマト品種は、‘サンパドル’、‘ルネッサンス’、‘べにすずめ’、等の品種が市場に存在するが、単為結果性品種が抱える不良形質の発現のため、一般的に普及している品種数が少ないのが現状である（Shinozaki et al., 2018）。例えば、‘ルネッサンス’、‘バルト’、あるいは‘ネネ’という品種は単為結果性を誘導する *pat-2* という遺伝子変異を用いて開発されたが、果実が裂ける、果実が柔らかくなる、といった不良形質を伴う。そのため、不良形質の付随しない新規の単為結果性品種や、単為結果メカニズムの解明による新しい着果の制御技術が求められている。

#### 3-2 同定された単為結果の原因遺伝子と果実形成のメカニズム

##### 3-2-1 ジベレリンと単為結果

トマトの着果が誘導されるメカニズムにおいて、古くから植物ホルモンのオーキシシンとジベレリンとの関連が示されている。オーキシシンとジベレリンはそれぞれ受精後の子房の細胞分裂と細胞伸長を促し、受粉後の急速な子房肥大を促進させる役割がある。オーキシシンとジベレリンは、合成後にそれぞれ受容体に結合し、情報伝達経路を経て着果誘導を含む様々な生理反応を活性化する（図2）。そのため、これらの情報伝達経路を活性化させる遺伝子変異により、受粉なしの着果誘導である単為結果を引き起こすことができる（武井ら、2017）。

通常、受粉後のトマトの胚珠においては、オーキシシンがまず蓄積し、それがジベレリン代謝を活性化させる。このとき、ジベレリン合成に関与する *GIBBERELLIN 20-*



*OXIDASE (GA20ox)* 遺伝子ファミリーや、*ENT-COPALYL DIPHOSPHATE SYNTHASE (CPS)* 遺伝子等の発現量が増え、一方で、ジベレリン不活性化遺伝子である *GA2ox* 遺伝子ファミリーの一部が発現低下する (Serrani et al., 2007, 2008,). 実際に、*GA2ox* 遺伝子ファミリーの発現抑制や、柑橘由来の *GA20ox1* 遺伝子のトマトにおける過剰発現によりジベレリン代謝が活性化して単為結果が誘起されることが報告されている (García-Hurtado et al., 2012, Martínez-Bello et al., 2015). また、雌蕊におけるジベレリン含量の増加は、正のフィードバック制御を引き起こしジベレリン情報伝達経路の活性化を促すが、これはジベレリン反応を抑制する DELLA タンパク質と、それと相互作用する転写因子 (Transcription Factor, TF) との相互作用を介して調節される。トマトには、ゲノムに DELLA タンパク質が 1 コピー存在し、SIDELLA/PROCERA の機能欠損が単為結果などのジベレリン応答を誘導することが示されている (Jasinski et al., 2008, Martí et al., 2007). 加えて、ジベレリン感受性の高い *Sldella/procera* 変異体においては単為結果が誘導されるものの、単為結果果実において細胞分裂活性が低下して果肉の細胞数が減少することが報告されている。(Carrera et al., 2012)

### 3-2-2 雄性不稔と単為結果

RNA シーケンスを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、トマトの着果時に転写量に変動する遺伝子群が報告されている。そのなかで、MADS ドメインを持つ転写因子 (MADS-box 遺伝子) ファミリーに属する多くの遺伝子の発現量が、トマトの着果時に低下する (Vriezen et al., 2008, Wang et al., 2009, Tang et al., 2015, Ruiu et al., 2015, Zhang et al., 2016). 例えば、*TOMATO MADSbox 29 (TM29)* 遺伝子と *TM5* 遺伝子は、それぞれシロイヌナズナの MADS-box 遺伝子 *SEPATALA2 (SEP2)* 遺伝子と *SEP3* 遺伝子のオーソログである。それぞれの変異体である *tm29* 変異体と *tm5* 変異体は、単為結果に加え、雄蕊の分化初期からの発達異常を示す (Pnueli et al., 1994, Ampomah-Dwamena et al., 2002, Pelaz et al., 2000). また、花卉および雄蕊の分化へ関与する B クラスの MADSbox 遺伝子である *TOMATO APETALA3 (TAP3/SIDEF)* 遺伝子の発現抑制体と *TM6* 遺伝子の発現抑制体においても同様の現象が報告されている (de Martino et al., 2006, Quinet et al., 2014). 加えて、雄蕊の発達異常が単為結果をもたらすことは、雄蕊特異的なリボヌクレアーゼ遺伝子である *BARNASE* 遺伝子を用いてトマトの雄蕊の分化初期の発達を阻害した形質転換体で単為結果が誘導されたことから支持される (VivianSmith et al., 2001,

Medina et al., 2013) . さらに, 雌雄不稔性と雌雄配偶子形成異常とともに誘導される単為結果も報告されていることから, 配偶子形成異常が着果を促進する要因であることが示唆される (Hao et al., 2017, Rojas-Gracia et al., 2017).

### 3-3 本研究で扱う単為結果変異体 *spff*

#### 3-3-1 単為結果する *spff* 変異体の単離

所属研究室の先行研究により, 矮性トマト品種 ‘Micro-Tom’ のガンマー線照射由来変異体集団の M<sub>3</sub> 個体群 (Matsukura et al., 2007, Saito et al., 2011) を目視でスクリーニングし, 小さい単為結果果実を結実する変異体 (TOMJPG4121) が単離された. TOMJPG4121 は花弁や葯を含む花器官が野生株と比べて小さいという特徴を示したことから, *small parthenocarpic fruit and flower* (小さい単為結果果実と花) (*spff*) 変異体と名付けられた (図3). また, 自家受粉により種子を得られず, ‘Micro-Tom’ 野生株由来の花粉との交配で種子を得られたことから, *spff* 変異体は雄性不稔性を持つ可能性が示唆された. *spff* 変異体を ‘Micro-Tom’ 野生株と交配して得られた 6 個体の F<sub>1</sub> 個体は, 全個体で野生型の表現型を示した (花器官の縮小と単為結果を示さなかった) ため, 原因遺伝子は潜性であることが分かっていた. 加えて, ‘Micro-Tom’ 野生株との交配により得られた 109 個体の F<sub>2</sub> 集団のうち 33 個体, ‘Ailsa-Craig’ 野生株との交配により得られた 186 本の F<sub>2</sub> 個体のうち 43 個体が *spff* 変異体の表現型 (花期間の縮小と単為結果) を示した (表 1). これら F<sub>2</sub> 集団の分離比は野生型 : 変異型 = 3 : 1 に対応 (カイ二乗検定=1.62 (‘Micro-Tom’), 0.35 (‘Ailsa-Craig’),  $p < 0.05$ ) していた. このことから, *spff* 変異体の表現型は単一の潜性遺伝子であることが推定された. また, 作出された F<sub>2</sub> 集団の初花の開花日は *spff* 変異体の表現型を示す個体で遅く, ‘Micro-Tom’ 系統では 19 日, ‘Ailsa-Craig’ 系統では 15 日, 野生型の表現型を示す個体と比べて遅延した (図 4).

#### 3-3-2 *spff* 変異体の遺伝子同定

*spff* 変異体 (遺伝背景 ‘Micro-Tom’) と野生株 (遺伝背景 ‘Ailsa-Craig’) との交配により得られた F<sub>2</sub> 集団を用いて, Solanaceae Coordinated Agricultural Project (SolCAP) アレイを用いた illumina SNP Infinium 解析により *spff* 変異がマッピングされた (図 5) (Sim et al., 2012). 野生型の表現型を示す 143 株および *spff* 変異体型の表現型を示す 43 株の合計 186 株の F<sub>2</sub> 植物を対象として, 1956 個の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism,

SNP) マーカーを用いてジェノタイピングした結果、第4染色体上の2つのSNP マーカー (solcap\_snp\_sl\_36809 と solcap\_snp\_sl\_3746) によって挟まれる 2.6 Mb の領域における SNP index がその他の領域よりも高いこと (Micro-Tom allele frequency > 0.9) が明らかになった。栽培トマトの参照配列 SL2.40 より、これら 2 つのマーカーが、それぞれ 57,939,715 bp と 60,553,996 bp の位置に存在することがわかった。また、他の候補遺伝子座は検出されず、この結果は *spff* 変異体の表現型が単因子潜性の遺伝様式を示すという結果と一致した。かずさマーカーデータベース (<http://marker.kazusa.or.jp/Tomato/>) により、この候補領域には 267 個のタンパク質コード遺伝子 (SL2.4・ITAG2.3 参照) が含まれていることが明らかになっていた。

‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体を掛け合わせて得られた F<sub>2</sub> 集団を用いて、全ゲノムシーケンスによるマッピングが行われた。F<sub>2</sub> 集団のうち、野生型を示す集団と *spff* 変異体型を示す集団のゲノムをそれぞれバルクにし、HiSeq 2000 (illumina) の 100 bp ペアードシーケンス法によってそれぞれの配列情報が得られていた。得られた配列情報は農研機構の矢野亮一博士により Bowtie2-Samtools-Genome Analysis Toolkit (GATK) パイプラインを用いて解析され、*spff* 変異体型の個体に共通して存在する変異情報が取得された。なかでも非同義アミノ酸置換、異常な位置の停止コドン、またはフレームシフトを引き起こす可能性がある SNP および Indels (insertion/deletion) は、HaplotypeCaller を使用して識別され、それぞれの対立遺伝子の頻度も GATK により取得された。次に、それぞれの変異について読み取られたリードのうち変異を含むリードの割合 (SNP/Indel インデックス) が計算され、読み取られたリードの厚みを示す depth 値が高く (≥10)、かつ SNP / Indel インデックスが高い変異である 77 個の変異が、候補遺伝子変異として特定されていた (表 2)。候補変異は計 46 個の遺伝子に座乗していた (表 3)。しかし、46 個の遺伝子のうち、どの遺伝子が *spff* 変異体に単為結果をもたらす原因遺伝子なのかは明らかにされていなかった。

## 4. 本研究の目的と概要

### 4-1 目的

本研究では、トマトの採種および生産にかかる労働負荷を低減するための基盤技術の構築を目的とした。まず、トマトの F<sub>1</sub> 採種から除雄作業を省略することのできる、CMS トマトと訪花昆虫クロマルハナバチを利用した採種システムの実用化に際して、

花粉親と種子親が抱える課題をそれぞれ解決する。花粉親が抱える「トマトの *Rf* 遺伝子が未同定」という課題に対し、*Rf* 遺伝子を持つとされる 2 つの野生種トマト *Solanum pimpinellifolium* ‘LA1670’, *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の参照ゲノムを構築する。また、*S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の持つ *Rf* 遺伝子の座乗領域を明らかにし、*Rf* 遺伝子の候補を同定する。加えて、種子親が抱える「葯が柱頭を覆う構造をしている」という課題に対し、柱頭が露出している 2 系統 ‘IL2-5’ ‘品種 B’ を維持系統として用いた柱頭露出型 CMS 系統を作出し、それらのハチによる受粉効率を明らかにする。次に、トマトの生産現場から受粉作業を省略することのできる単為結果性に着目し、トマトに単為結果性をもたらす新規遺伝子の同定と、同定した遺伝子による着果のメカニズムの解明を行う。

#### 4-2 研究の概要

第 1 章では、CMS を用いた除雄不要な  $F_1$  採種システムの構築における、花粉親と種子親の課題解決を目指した。まず、花粉親の課題解決のため、*Rf* 遺伝子の候補の同定を行った。ロングリードシーケンサーとショートリードシーケンサーを用いて 2 つの *Rf* 系統トマト *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ のゲノム配列を取得し、12 本の擬似染色体を構築した。構築した擬似染色体に対して発現遺伝子の情報を付与するため、発達段階の異なる葯を含む複数の器官の 17 サンプルを対象とした RNA シーケンスを行い、それぞれの系統で 29,629 個と 29,185 個の発現遺伝子 (transcripts per million, TPM > 0) を同定した。発現遺伝子のうち、*Rf* 遺伝子の候補を同定するため、まず *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の持つ *Rf* 遺伝子が CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ の花粉稔性を回復させる様式を  $F_2$  集団の分離比より解明し、次に  $F_2$  集団を対象として Double Digest Restriction Site Associated DNA Sequence (ddRAD) シーケンスを用いた *Rf* 遺伝子のラフマッピングを行った。なお、‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ は ‘CMS[MSA1]’ に対して栽培品種 ‘品種 A’ を維持系統として 7 回戻し交雑した系統である。その結果、*Rf* 遺伝子が座乗すると推定される領域を █████ 染色体の 4.7 Mb の領域に絞りこんだ。次に、種子親の課題解決のため、花柱が伸長する遺伝子変異 *style2.1* を持つ ‘IL2-5’、および柱頭が露出する形質を持つ ‘品種 B’、を維持系統とした 2 系統の CMS 系統を作出した。作出した柱頭露出型 CMS 系統、並びに柱頭の露出しない CMS 系統、および稔性系統を同じ温室で栽培し、除雄作業を行わずに、訪花昆虫ク

ロマルハナバチを用いて F<sub>1</sub> 採種を行った。結果として、柱頭が露出する CMS 系統で F<sub>1</sub> 採種が可能であることを実証した。また、ハチによる交配と人為による交配を行い、採種効率を比較した結果、非柱頭露出型 CMS 系統ではハチによる交配で採種数が大幅に減少したのに対し、柱頭露出型 CMS 系統では採種数が減少しにくいことが示された。

第 2 章では、受粉不要なトマト生産を可能にする、新規の単為結果性遺伝子の同定とその機能解明を行った。実験用トマト品種 ‘Micro-Tom’ の大規模突然変異体集団より単離された、単為結果性を示す *spff* 変異体を材料として、連鎖解析による原因遺伝子の絞り込みと RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) 法による単為結果性原因遺伝子の検証を行った。その結果、第 4 染色体上の *Solyc04g077010* にコードされる受容体様タンパク質の機能欠損が単為結果を含む *spff* 変異体の表現型を引き起こしていることを明らかにした。次に、*SPFF* 遺伝子の機能解明のため、*spff* 変異体の栄養器官と生殖器官における表現型の詳細な特徴付けや、未受粉の雌蕊を用いた RNA シーケンスによる網羅的な発現遺伝子解析、相同遺伝子の機能欠損体との表現型の比較等を行った。その結果、花托の維管束細胞での発現量が高い受容体様タンパク質の機能欠損が、ジベレリン合成遺伝子の発現促進やジベレリン不活化遺伝子の発現抑制をもたらし、受粉前の子房細胞の肥大ひいては単為結果を誘導する可能性が示唆された。

## 5. 図表

表 1. F<sub>1</sub> 植物を自殖して得た F<sub>2</sub> 集団における *spff* 変異型個体の分離試験結果

親系統品種	分離比調査に用いた F <sub>2</sub> 個体の数			
	合計	野生型	<i>spff</i> 変異型	$\chi^2$ (3:1)
<i>spff</i> × ‘Micro-Tom’ (野生株)	109	76	33	1.62 ns
<i>spff</i> × ‘Ailsa-Craig’ (野生株)	186	143	43	0.35 ns

‘Micro-Tom’ 野生株との F<sub>1</sub> から 109 個体, ‘Ailsa-Craig’ 野生株との F<sub>1</sub> から 186 個体の F<sub>2</sub> 集団を得た. 表現型は, 花の縮小と単為結果果実の形成を以て, *spff* 型の表現型であると特徴付けられた. F<sub>2</sub> 集団の表現型の分離比が, 野生型と *spff* 変異型でおよそ 3:1 に分離したことから, *spff* 変異型の表現型は一因子潜性の遺伝子によりもたらされると推察された. (Takei et al., 2019)



#CHROM: 染色体番号, POS; トマト参照ゲノム (SL2.40) 上の変異の物理的位置, REF ; SL2.40 に基づく 'Micro-Tom' 野生株のゲノム配列. ALT; *spff* 変異体型個体のゲノム配列, mutation type; 変異の種類, #sum; 変異の検出に使用した総リード数, #ref; REF と同じ配列を持つシーケンスリード数, #alt; ALT と同じ配列を持つシーケンスリード数. %alt; 総リード数 (#sum) に対する変異リード数 (#alt) の割合, gene/adjacent\_gene; 変異が存在すると予測される遺伝子の遺伝子番号. aa change; 変異により置換されるアミノ酸. type; 1 アミノ酸の非同義変異 (missense) あるいはフレームシフトによる停止コドンの生成 (frameshift/deletion) を示している. 灰色でハイライトした遺伝子は, 本研究で RNAi 法による発現抑制を行った遺伝子を示す. (Takei et al., 2019)



表 3. NGS により絞り込まれた領域内で変異を持つ 46 個の候補遺伝子

Candidate gene	short_description (TAIR10)
Solyc04g074490	transferases, transferring glycosyl groups
Solyc04g074530	GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein
Solyc04g074540	GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein
Solyc04g074550	cytochrome C oxidase 6B
Solyc04g074560	member of SYP12 Gene Family
Solyc04g074590	Seryl-tRNA synthetase
Solyc04g074650	vacuoleless1 (VCL1)
Solyc04g074680	unknown protein
Solyc04g074740	Cupredoxin superfamily protein
Solyc04g074750	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein
Solyc04g074760	unknown protein
Solyc04g074770	unknown protein
Solyc04g074780	unknown protein
Solyc04g074810	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein
Solyc04g074820	RING/U-box superfamily protein
Solyc04g074850	MATE efflux family protein
Solyc04g074860	MATE efflux family protein
Solyc04g074870	purine permease 1
Solyc04g074890	Ubiquitin-like superfamily protein
Solyc04g074930	unknown protein
Solyc04g074950	unknown protein
Solyc04g074960	unknown protein
Solyc04g074970	Phototropic-responsive NPH3 family protein
Solyc04g074980	auxin F-box protein 5
Solyc04g075000	Protein kinase superfamily protein
Solyc04g076010	unknown protein
Solyc04g076020	transducin family protein / WD-40 repeat family protein
Solyc04g076100	unknown protein
Solyc04g076110	unknown protein
Solyc04g076120	serine carboxypeptidase-like 18
Solyc04g076140	Rho GTPase activation protein (RhoGAP) with PH domain
Solyc04g076150	unknown protein
Solyc04g076180	cell division cycle protein 48-related / CDC48-related
Solyc04g076190	Eukaryotic aspartyl protease family protein
Solyc04g076200	Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein
Solyc04g076210	ubiquitin-specific protease 16
Solyc04g076250	glutamate-ammonia ligases;catalytics;glutamate-ammonia ligases
Solyc04g076260	unknown protein
Solyc04g076290	O-fucosyltransferase family protein
Solyc04g076300	MSCS-like 3
Solyc04g076320	L-Aspartase-like family protein
Solyc04g076330	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein
Solyc04g076760	oligopeptide transporter 4
Solyc04g076940	unknown protein
Solyc04g077010	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein (XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM 1)
Solyc04g077900	cyclin d4;2

Candidate gene; 変異が存在する遺伝子のアノテーション, short\_description (TAIR10); Candidate gene の相同遺伝子の名称. 合計 46 個の候補遺伝子のうち, 33 個の遺伝子について, 相同性の高い遺伝子が同定された. 灰色でハイライトした遺伝子は, 本研究で RNAi 法による発現抑制を行った遺伝子を示す. (Takei et al. 2019)

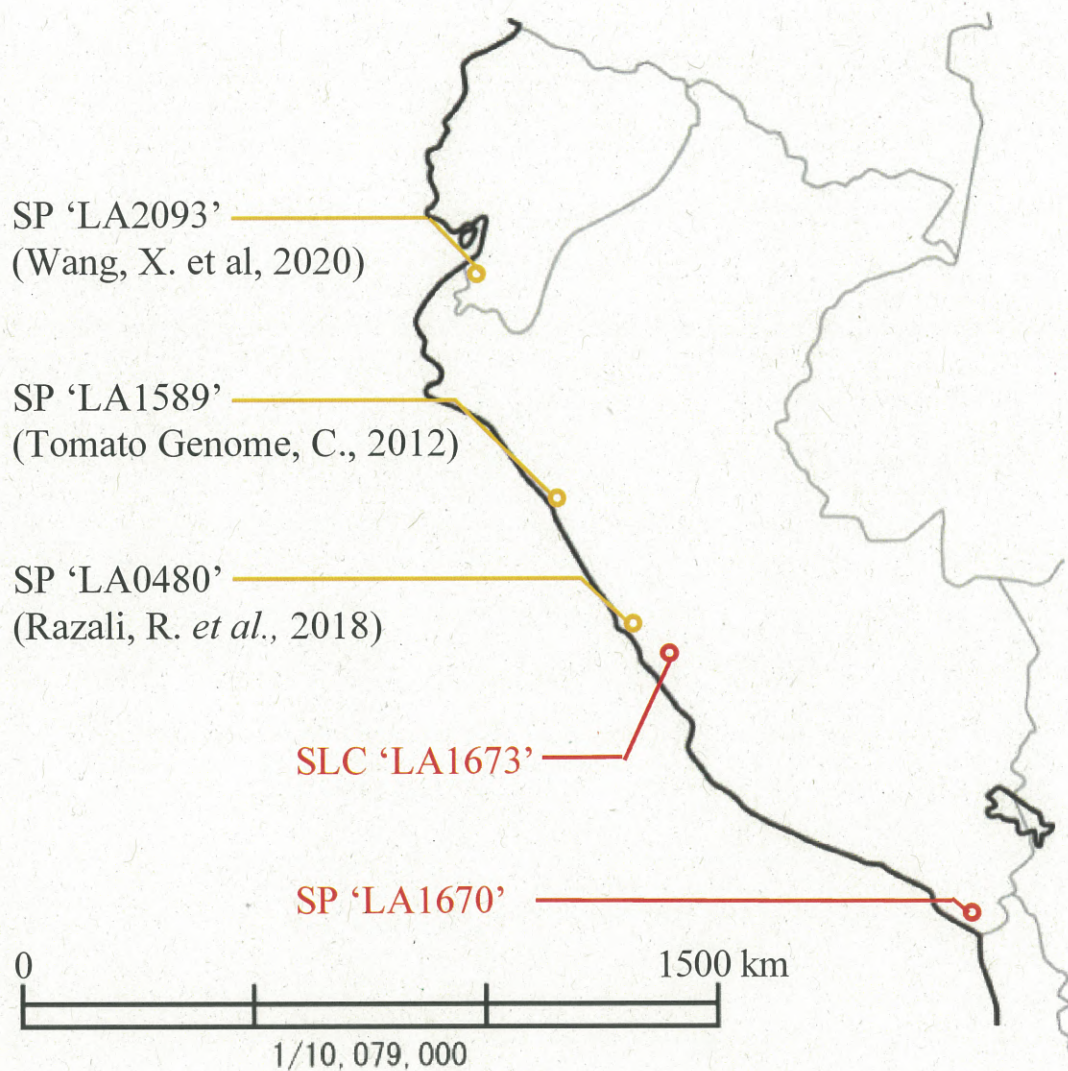


図 1. 本研究で使用了した稔性回復系統が採集された地理的位置

本研究で使用了したアクセシヨンの産地を赤丸で示した. SP 'LA1670'は, SP 'LA2093', SP 'LA1589', SP 'LA0480' と比べて南方に位置する地点で採集された. SP, *S. pimpinellifolium*, SLC, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. 地図データ提供: OpenStreetMap (openstreetmap.org; OpenStreetMap contributors) (Takei et al., 2021)

## 着果誘導機構

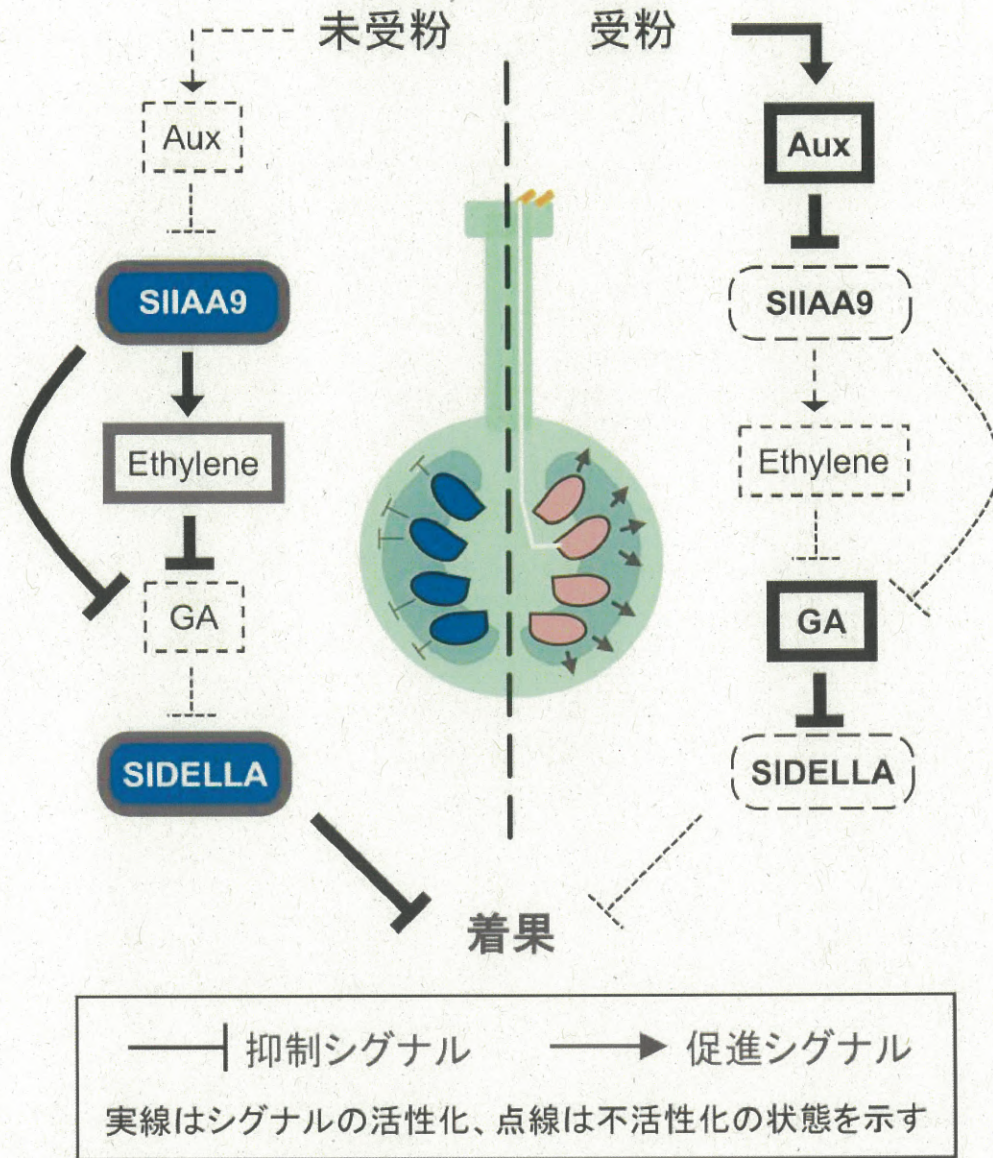


図2. 植物ホルモンが着果を誘導する機構

未受粉の雌蕊では、SIIAA9 および SIDELLA が着果を抑制している。受粉後の雌蕊では、オーキシン合成の活性化が SIIAA9 の抑制活性を不活性化させ、エチレン合成の低下を介してジベレリンの合成が促される。ジベレリン合成が SIDELLA の抑制活性を不活性化し、着果が誘導される。なお、エチレンによるジベレリン合成の抑制は一義的な抑制経路ではなく、オーキシンからジベレリンへの直接的な制御の可能性も考えられている。(武井ら, 2017)

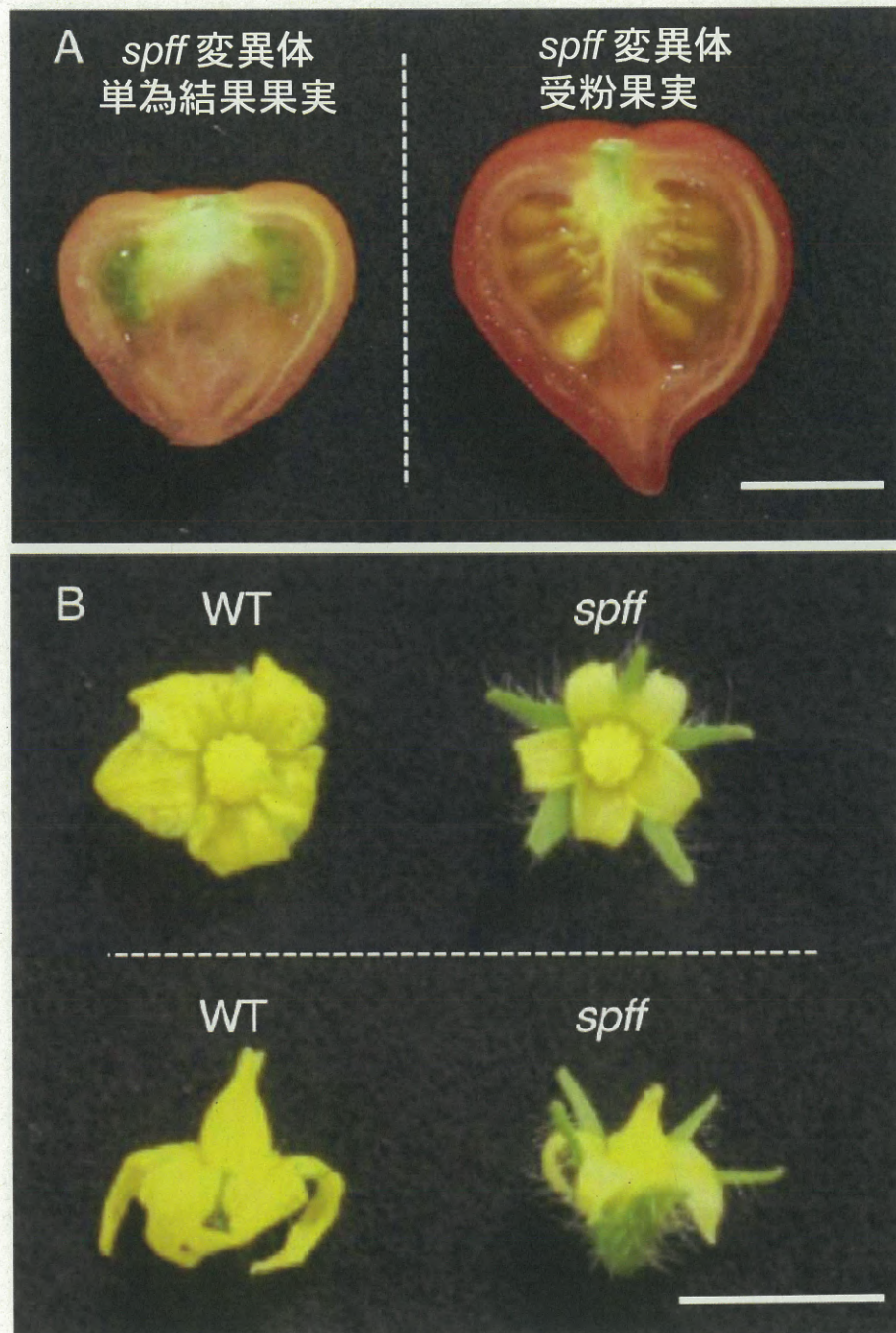


図 3. *spff* 変異体の果実と花

*spff* 変異体は単為結果果実を形成する。また, *spff* 変異体の花は野生株と比べて小さいという特徴がある。(A) *spff* 変異体の代表的な単為結果果実 (左) と ‘Micro-Tom’ 野生株の花粉を用いて受粉した場合の果実 (右) を示す。(B) 開花日における ‘Micro-Tom’ 野生株の花と *spff* 変異体の花の比較. スケールバー = 1 cm. (Takei et al., 2019)

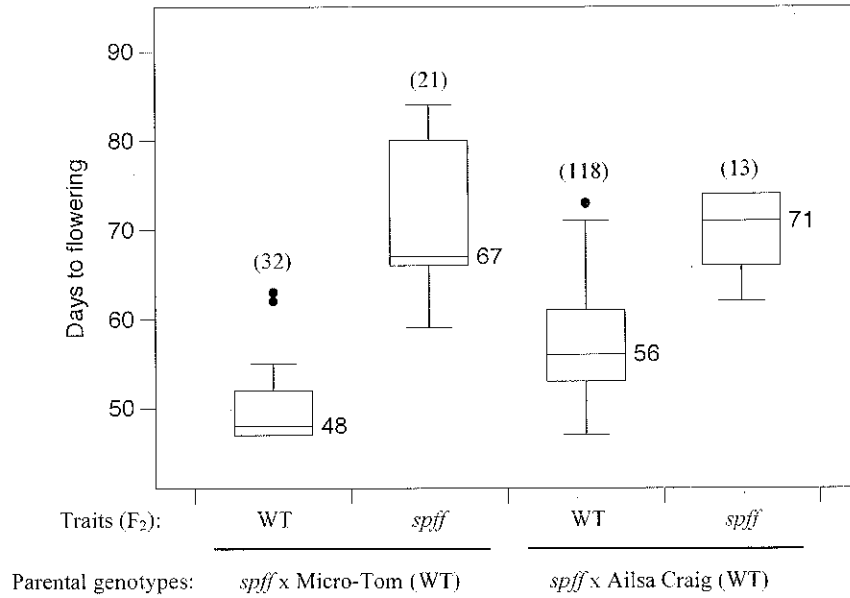


図 4. F<sub>2</sub> 集団で野生型を示す個体と *spff* 変異体型を示す個体の初花の開花日

F<sub>2</sub> 集団の *spff* 変異体型と野生型の区分は、花の矮小化と単為結果果実の形成を以て判断した。左 2 系統が ‘Micro-Tom’ 野生株との交配で得られた F<sub>2</sub> 集団、右 2 系統が ‘Ailsa-Craig’ 野生株との交配で得られた F<sub>2</sub> 集団の観察結果を表す。箱ひげ図は、播種から初花の開花までの日数を示す。箱は四分位範囲 (Inter Quarter Range, IQR) を示す。箱の下端が第 1 四分位値、箱の上端が第 3 四分位値、箱内の線画中央値を表す。データ範囲を箱上下のひげで示し、外れ値は点で示した。観察に使用した野生型を示す個体と *spff* 変異体型を示す個体のそれぞれの個体数を括弧内の値で示した。‘Micro-Tom’ 野生株、‘Ailsa-Craig’ 野生株の交配で得られた両方の F<sub>2</sub> 集団について、*spff* 変異体型では、野生型と比べて、開花日が遅延した。(Takei et al., 2019)

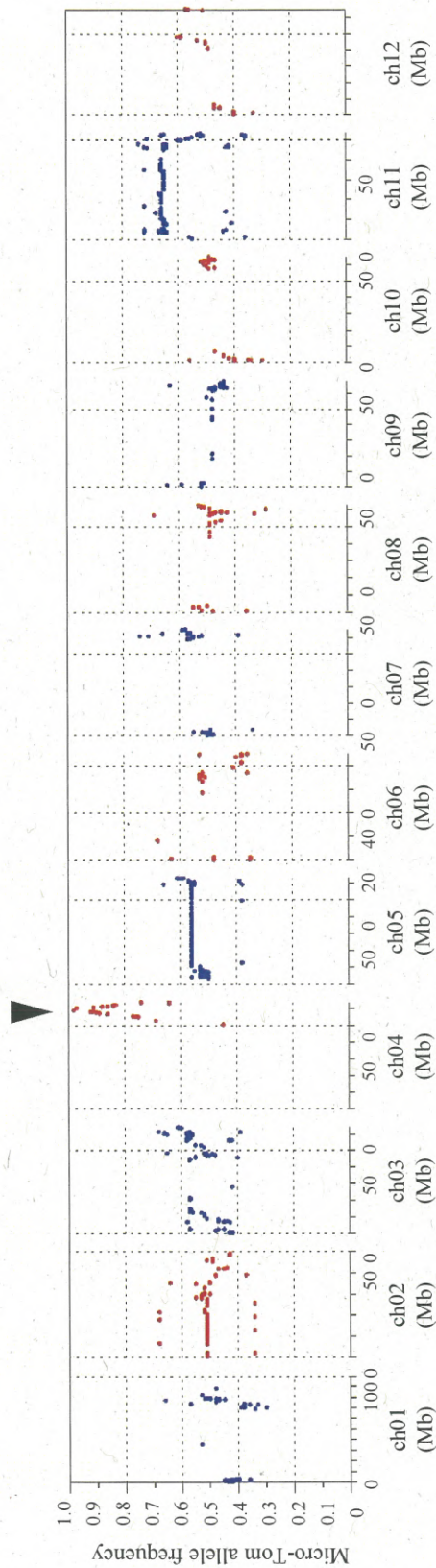


図 5. SNP マーカーの対立遺伝子頻度

‘Ailsa-Craig’ 野生株との交配で得られた F<sub>2</sub> 集団のうち, *spff* 変異体型の表現型を示した個体を対象として, 各 SNP マーカーの位置における ‘Micro-Tom’ 型の対立遺伝子頻度を示した. 偶数番号と偶数番号の染色体上の SNP マーカーをそれぞれ赤と青で表した. 矢印は ‘Micro-Tom’ 型の対立遺伝子頻度が最も高くなったクラスターのピークを示す. 第四染色体上の 1 箇所に ‘Micro-Tom’ 型の対立遺伝子頻度が著しく高いピークが確認された. (Takei et al., 2019)

# 第 1 章

## 第1章 細胞質雄性不稔を用いた除雄不要な F<sub>1</sub> 採種システムの構築

### 1-1 緒言

CMS は、核と細胞質の遺伝子産物の不親和により正常な (稔性のある) 花粉が産生されない現象である。トマトにおいては、非対称性細胞融合による CMS 系統 ‘CMS[MSA1]’ が作出されたが、それを利用した採種システムが確立されていない。その原因は、花粉親と種子親にそれぞれ課題が存在するためである。花粉親の抱える課題は、果菜類の CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 採種において花粉親が持つべき遺伝子が同定されていないことである。CMS 植物に存在する遺伝子産物の不親和は、ミトコンドリアゲノムにコードされるタンパク質が原因であるが、果菜類の F<sub>1</sub> 採種においては CMS の稔性を回復できる稔性回復 (*Restorer of Fertility, Rf*) 遺伝子が必須である (Bohra et al., 2016)。種子親が抱える課題は、トマトの花の構造上、葯が筒状に柱頭を囲い覆っているために、他殖種子を得る効率が著しく低いことである。第1章では、CMS を用いた除雄不要な F<sub>1</sub> 採種システムの構築における、花粉親と種子親の課題解決を目指した。

まず、花粉親の課題解決のため、*Rf* 遺伝子の候補の同定を行った。ロングリードシーケンサーとショートリードシーケンサーを用いて2つの *Rf* 系統トマト *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ のゲノム配列を取得し、12本の擬似染色体を構築した (図 1-1, 図 1-2)。構築した擬似染色体に対して発現遺伝子の情報を付与するため、発達段階の異なる葯を含む複数の器官の 17 サンプルを対象とした RNA シーケンスを行い、それぞれの系統で 29,629 個と 29,185 個の発現遺伝子 (TPM > 0) を同定した。発現遺伝子のうち、*Rf* 遺伝子の候補を同定するため、まず *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の持つ *Rf* 遺伝子が CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ の花粉稔性を回復させる様式を F<sub>2</sub> 集団の分離比より解明し、次に F<sub>2</sub> 集団を対象として ddRAD シーケンスを用いた *Rf* 遺伝子のラフマッピングを行った。なお、‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ は ‘CMS[MSA1]’ に対して栽培品種 ‘品種 A’ を維持系統として7回戻し交雑した系統である。その結果、*Rf* 遺伝子が座乗すると推定される領域を染色体上の 4.7 Mb の領域に絞りこんだ。次に、種子親の課題解決のため、花柱が伸長する遺伝子変異 *style2.1* を持つ ‘IL2-5’、および柱頭が露出する形質を持つ ‘品種 B’、を維持系統とした2系統の CMS 系統を作出した。作出した柱頭露出型 CMS 系統、並びに柱頭の露出しない CMS 系統、および稔性系統を同じ温室で栽培し、除雄作業を行わずに、訪花昆虫クロマルハナバチを用いて F<sub>1</sub> 採種を行った。結果として、柱頭が露出する CMS 系統で F<sub>1</sub>



採種が可能であることを実証した。また、また、柱頭が露出していない CMS 系統ではハチによる交配で採種効率が著しく低下したが、柱頭露出型 CMS 系統ではハチによる交配で採種効率が比較的低下しにくい傾向が示された。

## 1-2 材料および方法

### 1-2-1 稔性回復系統 ‘LA1670’ ‘LA1673’の参照ゲノム構築

#### 1-2-1-1 供試植物

稔性回復系統 *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ 並びに *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ を筑波大学の Tsukuba-Plant Innovation Research Center (T-PIRC) 農場の温室で 2018 年 9 月～12 月に栽培した。毎日午前 8 時から午後 4 時まで 1 時間ごと (1 日 8 回) に、水 1L あたり大塚 2 号 7.56 g, 大塚 3 号 6.46 g, 大塚 5 号 0.4 g, 大塚 6 号 3.94 g, 大塚 7 号 1.2 g を溶かした培養液で灌水した。

#### 1-2-1-2 NGS 及び ddRAD シーケンスに用いた DNA の抽出

植物体から若葉 (長さ 2 cm 以下で薄い葉) を 5~7 枚採取し、輸送中に氷上で 4 時間保管し、実験室に戻った後、-80℃の冷蔵庫で保管した。凍結サンプルを 5.0 mm のジルコニアビーズ (バイオメディカルサイエンス) とともに 2 mL チューブに入れ、液体窒素で冷却した後、ティッシュライザー (Qiagen) により破碎した。ジルコニアビーズ以外の凍結破碎サンプルを用いて Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega) を使用してゲノムを 400  $\mu$ L の Elution buffer に溶出させた。NanoDrop (Thermo Scientific)を用いて濃度測定を行い、4℃で保存した。

#### 1-2-1-3 PacBio に用いた植物のサンプリング

植物体から若葉 (長さ 2 cm 以下で薄い葉) 5~7 枚を採取し、冷蔵便でかざ DNA 研究所に送付し、ゲノム解読とコンティグのアセンブルを依頼した。

#### 1-2-1-4 RNA シーケンスに用いた RNA の抽出

花粉は梅雨明け前である 2019 年 7 月 1 日～7 月 4 日に筑波大学 T-PIRC 農場でサンプリングした (参考: 最高気温が 23~28℃, 最低気温が 19~20℃)。チューブに入れた花粉およそ 3 mg を液体窒素で凍結させ、マルチビーズショッカー (安井器械) を用いて粉

砕した。RNA 抽出には RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使用した。Buffer RLT と  $\beta$ -メルカプトエタノールを容積比 100:1 で混合し、その 450  $\mu$ L を凍結粉碎したサンプルに添加した。キットのプロトコールに従って操作を行ったが、Buffer RPE の残留エタノールを除去するステップで、以下の通りのオリジナルな操作を加えた。RNA 溶出ステップの前に Buffer RPE の残留エタノールを完全に取り除く為に、Buffer RPE を添加し遠心操作するステップの後に、p10 のマイクロピペットと 10  $\mu$ L 用のピペットチップを用いてスピнкаラム内のリング上の buffer RPE を吸い取った。加えて、スピнкаラムを新しい 2mL コレクションチューブに移し、13.2 rpm で 5 分間の遠心操作を行った。その後、40  $\mu$ L の RNase free water を用いて RNA を溶出した。

#### 1-2-1-5 シーケンスデータに基づく擬似染色体の構築

かずさ DNA 研究所の白澤健太博士により、下記のように PacBio で取得したリードからプライマリーコンティグが組み立てられた。まず、SMRTbell Express Template Prep Kit を用いて作った SMRT シーケンスライブラリーを、PacBio Sequel system (PacBio, Menlo Park, CA, USA) で配列解読することで長鎖シーケンスリードが得られた。Falcon-unzip を用いてプライマリーコンティグへと組み立てられ、Arrow を用いて 2 回シーケンスエラーの補正が行われた (表 1-1)。

長鎖シーケンサーは第二世代シーケンサーと比較して読み取時のエラー率が高いことが知られていた為、白澤博士より受け取ったプライマリーコンティグに対して第二世代シーケンサーで得られたリードを用いてエラー補正を行う方策をとった。読み取り長 150 bp のペアエンド (PE) のリードを illumina Hiseq 2000 (Illumina, Macrogen, Japan) で取得したのち、TrimGalore (version 0.6.4) を用いてクオリティスコアが 30 未満の塩基と、アダプターシーケンスを除去した (表 1-1)。FastQC を用いてシーケンスの品質を改めて確認し、Pilon を用いて 47 $\times$ 相当の第二世代シーケンサー由来のトリミングされたリードによって、長鎖シーケンサー由来のプライマリーコンティグの配列を補正 (研磨) した (表 1-1)。

次に、RaGOO を用いて pilon で処理したコンティグを既存のゲノム配列情報 SL4.0 に対してアライメントし、擬似染色体を構築した。RaGOO によりアライメントされた染色体 (SL4.0ch00~SL4.0ch12) に対応する擬似染色体を、'LA1670' (SPI\_r1.1pmol) および 'LA1673' (SLYcer\_r1.1pmol) において、それぞれ SPI1.1ch00~SPI1.1ch12, SLYcer1.1ch00

～SLYcer1.1ch12 と名付けた. 'Heinz 1706' 参照ゲノム (SL4.0) のどの染色体にもマップされないプライマリーコンティグは, それぞれ SPIUN および SLYcerUN に纏められた (UN; unknown).

#### 1-2-1-6 アセンブリの完全性の評価

構築した擬似染色体の完成度を評価するため, Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) database (v.4.1.1) をゲノムモードで実施した.

緑色植物界 (viridiplantae) (Creation date: 2019-11-20, 種数: 57, BUSCO 数: 425), 陸上植物 (embryophyte) (Creation date: 2019-11-20, 種数: 50, BUSCO 数: 1614), 真正双子葉類 (eudicots) (Creation date: 2019-11-20, 種数: 31, BUSCO 数: 2326) で保存されている遺伝子を検索することで, 'LA1670' および 'LA1673' ゲノムアセンブリの完全性を評価した.

#### 1-2-1-7 構築した参照ゲノムの構造の比較

SL4.0 と構築したゲノム構造を比較するため, D-GENIES を用いた (表 1-1).

#### 1-2-1-8 RNA シーケンスによる遺伝子アノテーション検証

共同研究先の白澤健太博士により, 構築された擬似染色体内のタンパク質と遺伝子コード領域が MAKER パイプラインで予測された (表 1-1). MAKER パイプラインでの遺伝子予測時には, RNA シーケンスデータ, 並びにトマト (ITAG4.0), ジャガイモ (SolTub\_3.0), 及びコショウ (ASM51225v2) の 3 つのゲノム, 並びに AUGUSTUS と SNAP の 2 つのトレーニングセットが用いられた (表 1-1). Annotation edit distance score が 0.5 より大きい配列が, 信頼性の高い遺伝子とされ, 白澤博士より予測遺伝子のデータの提供を受けた.

実際に発現している遺伝子を検証するため, 合計 17 のサンプルから total RNA を RNeasy Mini Kit で抽出し, RNase-Free DNase Set (QIAGEN) で精製したのち, Novaseq-PE150 (Macrogen) による RNA シーケンス解析を行った. 17 のサンプルは, 7 つの異なる発達段階の蒴 (蕾サイズ: 3~4 mm, 4~5 mm, 5~6 mm, 6~7 mm, 7~8 mm, 8~9 mm, および開花期), 開花期の花粉, がく, 果実 (緑色), 果実 (赤熟), 葉, 子房, 開花前日の花弁 (白色), 開花期の花弁 (黄色), 根, 茎, であり, 2018 年 12 月から 2019 年 1 月までの

朝にサンプリングされた。サンプリングから RNA 精製までは有泉研究室の桑原康介氏により行われた。

RNA シーケンスの解析は以下のように行った。まず、クオリティスコアが 30 未満の塩基およびアダプター配列を、TrimGalore によって削除した。次に、リボソーム RNA (rRNA) の配列を SortMeRNA を使用して取り除いた (表 1-1)。得られた塩基配列情報を構築した擬似染色体にマッピングし、各遺伝子の転写レベルを STAR-RSEM パイプラインで計算した (表 1-1)。算出した TPM 値が 0 より大きい遺伝子を発現遺伝子と見なし、すべての器官で発現レベルが 0 だった遺伝子をフィルタリングした。染色体ごとの発現遺伝子の数をオリジナルの python スクリプトで数えた。

さらに、各 Rf 系統の花粉から抽出した RNA をもとに豊田敦博士により Iso-Seq 情報が取得されデータの提供を受けた。アイソフォームシーケンス (Iso-Seq) はスプライシングにより生じる転写産物のアイソフォームを同定することができる。まず、上述した花粉の RNA をもとに、Iso-Seq Express Oligo kit と NEBNext Single Cell/Low Input cDNA Synthesis & Amplification Module を用いて complementary DNA (cDNA) 合成が行われ、SMRTbell Express Template Prep Kit 2.0 によりライブラリが構築された。Sequel Binding Kit 3.0/Sequel Sequencing Kit 3.0 を使用して、PacBio Sequel により配列情報の解読が行われた。Iso-Seq の結果から、花粉での発現が確認された遺伝子を、遺伝子アノテーションのリストに追加した。

## 1-2-2 細胞質雄性不稔系統の遺伝様式の評価

### 1-2-2-1 CMS 系統の葯の表現型観察

#### 1-2-2-1-1 供試植物のサンプリング

非対称性細胞融合により作出された細胞質雄性不稔トマト ‘CMS[MSA1]’ (Melchers et al., 1992) を維持系統 ‘品種 A’ で 7 回戻し交雑した ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’、および維持系統である栽培品種 ‘品種 A’ を供試した。サンプリングは 2018 年 6 月 13 日にトキタ種苗株式会社の大利根研究農場 (埼玉県加須市) にて行われた。サンプリング時は梅雨明け前で、加須市の気温は 25°C 程度 (参考: 埼玉県久喜市の当日の平均気温は 22.1°C (表 1-2)) であった。

### 1-2-2-1-2 FAA 固定液による固定

37%ホルムアルデヒド, 酢酸, 70%エタノールを 1:1:18 の容積比で混合し Formalin-Acetic acid-Alcohol (FAA) 固定液を作成した. トキタ種苗にて栽培されている植物体から蕾を含む花房を採取した. 花房は採取後直ちに (5 秒以内に) ガラス瓶内の FAA 固定液に漬けた. 蕾の内部に固定液を浸透させる為にガラス瓶を手で振り激しく攪拌したのち, 氷上に静置した状態でおよそ 3 時間かけて大学に車で輸送した. サンプルの組織中に FAA を完全に浸透させるため, FAA に漬けたサンプルを, 真空ポンプを接続した密封容器に入れ, FAA が沸騰しないようにゆっくりと  $-0.09$  MPa まで減圧した.  $-0.09$  MPa 環境下にて 2 時間静置して脱気した. その間, サンプル中の水分が FAA 固定液を薄めることを防ぐために FAA 固定液を新しいものと 2 回交換し, 同様に脱気を行った. 脱気後, サンプルを 4 度の冷蔵庫で 31 日間保存した (表 1-3).

### 1-2-2-1-3 切片作成

FAA 固定液をパラフィンに置換するために, 第三ブチルアルコールシリーズを作成した (表 1-4). FAA 固定液から第三ブチルアルコールシリーズ 1 液に置換し, サンプルが乾かないように 1 液に浸した状態で蕾のサイズをノギスで測定した. 花房からそれぞれの蕾を分解すると同時に, 異常な形態を示しがちな第一花を取り除き破棄した. その後, 第三ブチルアルコールシリーズ 1 液, 2 液, 3 液, 4 液, 5 液, にそれぞれ 24 時間以上浸したのち, 第三ブチルアルコールの結晶化を防ぐために  $25^{\circ}\text{C}$  の培養室に移して 6 液に 80 時間以上浸した. 6 液は 24 時間以上ごとに新しい液に 2 回交換した. その後, 6 液に浸かった状態のサンプルを恒温器で  $60^{\circ}\text{C}$  に加温し,  $60^{\circ}\text{C}$  で液状化した等量のパラフィンと混合した. その後, 恒温器内で 2 日間静置し 6 液を揮発させ, 第三ブチルアルコールの臭気がしないことを確認したのち, 室温でそれぞれの蕾サンプルをパラフィンに包埋した.

サンプルを固定したパラフィン片を木製の土台にサンプルが完全に垂直になるように固定した. その後, パラフィン包埋されたサンプルを, ロータリーマイクロトーム (Thermo Scientific Microm HM 325 Rotary Microtome) を用いて  $10\ \mu\text{m}$  の厚みの切片にスライスした. スライスした切片をスライドガラス上で蒸留水に乗せ,  $42^{\circ}\text{C}$  のホットプレート上でパラフィンを伸展した. 目視によって蕾の断面の形を確認することを以て伸展が充分であるとして水を除去し,  $42^{\circ}\text{C}$  のホットプレート上で 15 時間静置して乾燥さ

せた。スライドガラスを室温で 0.05%トルイジンブルー溶液に 15 分間浸して切片を染色し、ピーカーに入れた水道水で洗浄した。そしてキムタオル上に傾斜をつけて置き約 10 時間かけて完全に乾燥させた。さらにパラフィンを除去する為にキシレンに 5 分間浸けた後、スライドガラス上のキシレンが揮発する前に、切片に Entellan new を 1 滴垂らしてカバーガラスをかけて包埋した。包埋したスライドガラスは 1 日以上ドラフト内でキシレンを揮発させた後、光学顕微鏡を用いて観察した。

### 1-2-2-2 F<sub>2</sub>分離比調査による稔性回復様式の推定

#### 1-2-2-2-1 供試植物

トキタ種苗が保有する稔性回復系統 ‘LA1670’ (*S. pimpinellifolium*) の種子、および ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ に稔性回復系統 ‘LA1670’ の花粉をかけ合わせた交雑 F<sub>1</sub> 種子を入手し、2018 年 3 月 14 日に播種して筑波大学の T-PIRC 農場にて水耕栽培した。F<sub>1</sub> 植物は開花前に花房に袋がけを行い他の植物との交雑を防ぎ、毎朝各花房に振動受粉処理を施して自殖による F<sub>2</sub> 種子を得た。F<sub>2</sub> 集団は 2018 年 8 月 7 日および 20 日に播種し、373 個体を秋栽培で育成した。

#### 1-2-2-2-2 F<sub>2</sub>分離比の調査

それぞれの個体に対して、5 つ以上の着果果実を、種子の有無および多少を目視で確認した。また、果実をつけていない個体、並びに種子が確認できなかった個体について花粉稔性を調査した。花粉稔性の調査は、アニリンブルー染色実験により行った。人為的な自殖受粉の 1 日後に子房を取り除いた雌蕊 (柱頭から花柱まで) をピンセットで採取し、1.5 mL チューブに 1 mL 入れた固定液 (99.5%エタノール : 氷酢酸 = 3:1) に浸して一晩以上室温で静置した。その後、固定液を捨て、1.5 mL チューブ内で各 1 mL の、5N 水酸化ナトリウム水溶液 (24 時間)、蒸留水 (1 分間×3 回)、0.01% (W/V) アニリンブルー + 0.1 M リン酸水素二カリウム溶液 (pH=10) (24 時間、遮光) へと溶液を交換した。先端をハサミで 2 mm 程切断した 1000  $\mu$ L チップ (ブルーチップ) で吸い上げてスライドガラス上にサンプルを移し、グリセロールを 1 滴たらしたのち、カバーガラスを乗せ、キムワイプをかけた上から親指で強く圧迫してサンプルを押しつぶした。暗室で光学顕微鏡にスライドガラスをセットし、紫外線を光源として組織を観察した。

種子形成あるいは無種子でも花粉発芽が確認された個体を可稔個体、花粉発芽の確認できない個体を不稔個体と判断し、その分離比を確認した。

### 1-2-2-3 ddRAD シーケンスのライブラリ調整

DNA をかす DNA 研究所に持ち込み、Double Digest Restriction-site Associated DNA Sequencing (ddRAD シーケンス) を行った。ゲノムの濃度を Quant IT ds BR で測定し、96 ウェル PCR プレートで蒸留水を使用して 25 ng /  $\mu\text{L}$  に調整した。次に、新しい 96 ウェル PCR プレートを使用して、各 DNA の 2.5  $\mu\text{L}$  を 0.5  $\mu\text{L}$  の 10x Fast Digest バッファー および 1.5  $\mu\text{L}$  の蒸留水と混合し 0.25  $\mu\text{L}$  の PstI および 0.25  $\mu\text{L}$  の MspI を氷上で加えた。乾かさなため、濡らしたキムタオルを入れた密閉袋にプレートを入れ、インキュベーターを使用して 37°C で一晚 (18 時間) 静置した (=DNA 溶液 A)。翌朝、各 5  $\mu\text{L}$  の DNA 溶液 A に対してライゲーションバッファー 6.3  $\mu\text{L}$ 、アダプター 0.0375  $\mu\text{L}$ 、PstI 0.125  $\mu\text{L}$ 、MspI 0.125  $\mu\text{L}$ 、T4 DNA リガーゼ 0.25  $\mu\text{L}$ 、蒸留水 0.55  $\mu\text{L}$  を添加した (=DNA 溶液 B)。乾燥を防ぐため DNA 溶液 B のプレートを粘着テープで閉じ、50 秒間遠心した後、22°C で一晚インキュベートした。翌朝、350 bp 未満の DNA 断片を除去するため、12.5  $\mu\text{L}$  のサンプル溶液 B を 7.5  $\mu\text{L}$  の AMPure ビーズ (Agencourt) と 96 ウェルプレートで混合し、ピペティングにより穏やかに混合した。室温で 10 分間静置した後、プレートを磁気スタンドに置き、さらに 5 分間静置して AMPure ビーズをスタンドの磁石に付着させた。ビーズを乱さないように留意しながらピペットで上清を除去した後、200  $\mu\text{L}$  の 70% エタノール (EtOH) (30 秒) でビーズを 2 回洗浄した。2 回目の洗浄後、10  $\mu\text{L}$  チップ (ホワイトチップ) でプレート内の EtOH を完全に除去し、ビーズの色が暗褐色から淡褐色に変わるまでプレートを乾燥させた。蒸留水 12.5  $\mu\text{L}$  をビーズに加え、ピペティングで攪拌することで DNA を溶解した。この DNA 溶液を蒸留水で 50 倍に希釈し、新しい 96 ウェルプレートに入れた。氷上で希釈 DNA 溶液 2  $\mu\text{L}$  に、アダプター (2 種類) 2  $\mu\text{L}$ 、10x KOD Buffer Plus 1  $\mu\text{L}$ 、dNTP 0.8  $\mu\text{L}$ 、MgSO<sub>4</sub> 0.4  $\mu\text{L}$ 、KOD Plus 0.2  $\mu\text{L}$ 、蒸留水 3.6  $\mu\text{L}$  を添加し、PCR 反応 (初期熱変性 95°C 3 分、熱変性 95°C 20 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分、最終伸長反応 72°C 5 分、20 サイクル) を行った。各サンプルを等量ずつ混合し、FAVOGEN PCR purification mini column で精製した後、30  $\mu\text{L}$  の蒸留水で溶出し、濃度を測定した。500~800 ng の DNA を蒸留水で 30  $\mu\text{L}$  に希釈した (=DNA 溶液 C)。DNA 溶液 C を BluePippin の 1.5% DF marker R2 gel cassette にセットして、300 bp~

900 bp の DNA アンプリコンを回収した。回収した DNA 溶液を FAVOGEN micro Elute キットで精製し、15  $\mu$ L の蒸留水で溶出した。溶出した DNA の濃度は Quant IT dsDNA HS で測定し、DNA サイズは TapeStation HS D1000 (Agilent) で測定した。

### 1-2-3 柱頭露出型 CMS 系統の作出とハチによる採種システムの評価

#### 1-2-3-1 供試植物

CMS 系統として ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ および ‘CMS[MSA1]品種 BBC3’ を供試した。2つの CMS 系統の維持系統 ‘品種 A’ と ‘品種 B’ はそれぞれ非柱頭露出型、柱頭露出型の表現型を持つ。一方、既知の柱頭露出性変異 *style2.1* を持つ ‘IL2-5’ は、非柱頭露出型系統 ‘M82’ の遺伝背景において *Solanum pennellii* 由来の染色体を導入した柱頭露出型系統である (Eshed, Y. and D. Zamir, 1995, Kai-Yi Chen et al., 2007)。本研究では、‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ に柱頭露出性を付与するために ‘IL2-5’ を用い、比較対象区として ‘M82’ を用いた。

#### 1-2-3-2 各植物体の *style2.1* 遺伝型の確認

##### 1-2-3-2-1 DNA マーカーの作成

‘IL2-5’ の柱頭露出変異 *style2.1* を確認できる既知の DNA マーカーを用いた。450 bp の欠失の有無の確認には BAC8 9340-10000 F1: CGAGAGAGGGGTATTTTCATGTC および BAC8 9340-10000 R1: CCTGACATATCTTTTAAGAATAATAA を用いた。750 bp の欠失の有無の確認には BAC8 13360-14590 F1: AAATGAAGACGGGCTCAAAA および BAC8 13360-14590 R1: AAAACCCAATGGCTTCGAC を用いた (Chen et al., 2017)。プライマーの合成はユーロフィンジェノミクス社に外注委託した。

##### 1-2-3-2-2 ゲノム抽出

‘IL2-5’ と ‘M82’ は、筑波大学 T-PIRC 農場で植物体から若葉 (長さ 2 cm 以下で薄い葉) を 5~7 枚採取し、5.0 mm のジルコニアビーズ (バイオメディカルサイエンス) とともに 2 ml チューブに入れて液体窒素で凍結させた。凍結させたサンプルを、ティッシュライザー (Qiagen) により破碎した後、ジルコニアビーズ以外の凍結破碎サンプルを用いて Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega) を使用してゲノム抽出を行った。



その他の個体については、筑波大学 T-PIRC 農場で植物体から若葉 (長さ 1 cm 以下の薄い葉) を 1 枚採取し、葉をピンセットで切って若葉の 1/2 を用いた。組織を 5.0 mm のジルコニアビーズ (バイオメディカルサイエンス) とともに 2 ml チューブに入れ、ティッシュライザー (Qiagen) により破碎した。400  $\mu$ L の DNA 抽出バッファー (200 mM Tris-塩酸 (hydrochloric acid, HCl) (pH 7.5), 250 mM 塩化ナトリウム (sodium chloride, NaCl), 25 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium lauryl sulfate, SDS)) を加え、室温にてボクテックスで攪拌した。80°C に温めたインキュベーターに 5 分間静置した後、14,000 rpm 室温で 1 分間の遠心操作を行った。沈殿したペレットを掻き乱さないように注意しながら、遠心分離された上清液を 200  $\mu$ L とり新しい 1.5 ml チューブに移した。そこに 200  $\mu$ L のイソプロパノールを加え転倒混和し、2 分間室温で静置した後、14,000 rpm 室温で 1 分間の遠心操作を行った。上清液を捨て、1.5 ml チューブの底を上にして清潔なキムタオルの上で 15~20 分間風乾した後、核酸を 100  $\mu$ L の TE で溶解した。

#### 1-2-3-2-3 *style2.1* の遺伝型確認のための PCR 条件

トマトの葉由来の genomic DNA (gDNA) をテンプレートとし、標的 DNA 配列を増幅させるための Polymerase Chain Reaction (PCR) を行った。PCR の組成は、KOD FX Neo(TOYOBO) 1 $\mu$ L, 2x PCR buffer for KOD FX Neo 25  $\mu$ L (TOYOBO), 2 mM Deoxyribonucleotides (dNTPs) 10  $\mu$ L, Forward Primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, Reverse Primer (10  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, deoxyribonuclease (DNase) free water 11  $\mu$ L, gDNA 1  $\mu$ L の計 50  $\mu$ L とした。反応条件は、94°C; 2 分の後、98°C; 10 秒, 55°C; 30 秒, 68°C; 60 秒を 35 サイクル行い、最後に 68°C; 3 分の反応を行った。

#### 1-2-3-2-4 電気泳動

PCR 増幅産物に容積比で 10% の DNA 蛍光染色試薬 Midori Green Direct (日本ジェネティクス) を添加した。20  $\mu$ L の PCR 増幅産物を 1% アガロースゲルの各ウェルにアプライし、100 V で 12 分間電気泳動を行った。UV イルミネータを用いて可視化し、結果の観察を行った。

### 1-2-3-3 ハチによる F<sub>1</sub> 採種システムの効率調査

#### 1-2-3-3-1 ハチによる訪花の有無の検証

花粉のないニンジンの CMS 系統には、花粉稔性の正常である系統と比べて有意にハチが訪花しないという先行研究を鑑み、花粉のあるトマト CMS 系統にハチが訪花するかどうかを確認した (Gaffney et al. 2019, Erickson 1983). トキタ種苗株式会社大利根農場の温室において、柱頭露出型 CMS 系統 ('CMS[MSA1]品種 B\_BC1') と花粉稔性のある実用品種系統を土耕栽培し、訪花昆虫クロマルハナバチの小規模コロニー商品であるアグリ・トップクロマルキューブ (Agrisect Inc.) を一箱設置して栽培した。栽培は 2019 年 8 月～12 月に行われ、ハチの放飼は 1 ヶ月間行った。

#### 1-2-3-3-2 ハチと人為による採種効率の比較

トキタ種苗株式会社大利根農場の 2 つの温室において、柱頭露出型 CMS 系統 ('CMS[MSA1]品種 B\_BC3', 'CMS[MSA1]IL2-5\_BC3', 'CMS[MSA1]IL2-5\_F1') と非柱頭露出型 CMS 系統 ('CMS[MSA1]品種 A\_BC8', 'CMS[MSA1]M82\_BC3', 'CMS[MSA1]M82\_F1') を土耕栽培した。片方の温室には、アグリ・トップクロマルキューブ (Agrisect Inc.) を一箱設置し、虫取り網で余剰なハチを捕獲して一株あたり匹数が 2~3 頭になるように調整したうえで人間による受粉や着果制限を介さず受粉を行った。もう一つの温室には、トキタ種苗株式会社の熟練の作業員らによる除雄と受粉を行い、それぞれの採種効率を比較した。栽培は 2020 年 3 月～7 月に行われ、ハチの放飼は 1 ヶ月行った。

## 1-3 結果および考察

### 1-3-1 稔性回復系統 'LA1670' 'LA1673' の参照ゲノム構築

#### 1-3-1-1 'LA1670' の参照ゲノム構築

PacBio Sequel により、'LA1670' からは 86.7 Gb (N50 = 29 kb) のリードを得た (表 1-5, 図 1-1). 得られたリードは FALCON を用いて 420 本のコンティグ (N50 = 9.8 Mb) にアッセンブルされた。アッセンブルされたコンティグの合計長は 818 Mb であり、これは *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* 'Heinz 1706' の高精度アッセンブルゲノム (SL4.0) の推定ゲノムサイズ 782 Mb とほぼ同等であった。Arrow を用いてコンティグを 2 回磨きアッセンブルした結果、244 本のコンティグ (N50 = 10.1 Mb) が得られた (表 1-1, 1-7).

一方, illumina HiSeq 2000 からは 112.4 Gb のリード (リード長 = 150 bp) を得た. TrimGalore により信頼度の低いシーケンスとアダプターシーケンスを削除したところ, 79.7 Gb のリードが得られた (表 1-5). 得られたショートリードから *K*-mer counting 解析を行った結果, ゲノムサイズは 786.2 Mb と推定された. 得られたリードのうち, ゲノムサイズに対して 47 倍量のカバレッジ (47×) のデータを用いて Pilon による 244 本のコンティグのエラー補正を行なった.

RaGOO を用いて, 244 本のコンティグをトマトの高精度参照ゲノム配列 (SL4.0) にマップし擬似染色体を組み立てたところ, うち 242 本のコンティグが栽培トマトの 12 本の染色体および第 0 染色体にマップされた (表 1-9, 1-10). コンティグ間のギャップは RaGOO により N で埋められた. 参照ゲノム上にマップされなかった 2 本のコンティグは, 合わせて 1,449,357 bp の長さがあり, 野生種トマトに特有の配列を持つことが示唆された (表 1-10).

#### 1-3-1-2 ‘LA1673’ の参照ゲノム構築

‘LA1673’ からは PacBio Sequel で 77.6 Gb (N50 = 30 kb) のリードを得た (表 1-6, 図 1-1). FALCON によるアセンブルにより 369 本のコンティグ (N50 = 9.4 Mb) が生成された. アセンブルされたコンティグの合計長は 809 Mb で, 上述の ‘LA1670’ 同様に, SL4.0 の推定ゲノムサイズと大きな違いはなかった. Arrow を用いて 2 回磨いたコンティグをアセンブルした結果, 201 本のコンティグ (N50 = 9.4 Mb) が得られた (表 1-7).

一方, illumina HiSeq 2000 からは 110.8 Gb のリード (リード長 = 150 bp) が得られた. TrimGalore によるフィルタリングにより, 78.1 Gb のリードを得た (表 1-6). 得られたショートリードで *K*-mer counting 解析を行い, ゲノムサイズを 786.2 Mb と推定した. 得られたショートリードのうち, 推定ゲノムサイズの 47×のデータを用いて 201 本のコンティグのシーケンシングエラーを補正した. その後, Sly1.0\_pctg000F.1 が手作業で分割された (1-3-1-3-1 項にて後述) (表 1-8). 分割後のコンティグに対して RaGOO を用いて ‘LA1670’ と同様に擬似染色体の構築を行なった結果, 202 本のコンティグのうち, 200 本が参照ゲノム上にマップされた (表 1-9, 1-10). マップされなかった 2 本のコンティグの長さは合わせて 61,018 bp であり, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* に特有の遺伝子配列やゲノム構造がこの領域に含まれる可能性が示唆された (表 1-10).

### 1-3-1-3 アセンブリの完全性の評価

#### 1-3-1-3-1 構築した参照ゲノムの構造比較

D-Genies を用いたドットプロット解析により, *S. l. lycopersicum* と ‘LA1670’ または ‘LA1673’ のゲノム構造を比較した. マクروسケールでみるとドットプロットの結果が区切れなく一直線上に並んだことから, アセンブルした ‘LA1670’ または ‘LA1673’ のコンティグが, 栽培種トマトの参照ゲノム全域にあたる範囲をほぼカバーしていることが示された. 一方, ミクروسケールでドットプロット結果を確認すると, 種間の構造バリエーション (欠失, 挿入, 反転) があることがわかった (図 1-3).

‘LA1673’ については, 第一アセンブルコンティグのドットプロットの結果 (図 1-4) より, ‘LA1673’ の第 1 染色体上の一部の配列が, *S. l. lycopersicum* ‘Heinz 1706’ (SL4.0) の第 8 染色体の配列と高い相同性を示した領域を指すことが示された. ‘LA1673’ より遺伝的に *S. l. lycopersicum* に遠いとされる ‘LA1670’ には同様の相同性が見られず, 加えて先行研究により解読された *S. l. cerasiforme* のゲノム配列と *S. l. lycopersicum* ‘Heinz 1706’ (SL4.0) 間にも同様の相同性が見られないことから, 第一アセンブルコンティグにアセンブルエラーがあった可能性が示唆された. そのため, 白澤博士に依頼し, 第 8 染色体の配列と高い相同性を示した領域を持つ ‘LA1673’ の第 1 染色体上のコンティグ Sly1.0\_pctg000F.1 を手作業で分割したデータの提供を受けた. 分割後のコンティグを再度 *S. l. lycopersicum* とドットプロットにより比較した結果, ドットプロットの結果が区切れなく一直線上に並んだ (図 1-3 B). このことから, 当初示された, *S. l. cerasiforme* と *S. l. lycopersicum* の異なる染色体間での高い配列相同性は Falcon-unzip のミスアセンブルに起因していると考えられた.

#### 1-3-1-3-2 BUSCO による参照ゲノムの完成度の評価

‘LA1670’, ‘LA1673’ でアセンブルした擬似染色体に, コアジーンセットの何割が含まれているかを明らかにするため, BUSCO での解析を行った (表 1-1). その結果, ‘LA1670’ では, 緑色植物亜界のコアジーンセット (viridiplantae\_odb10) 425 遺伝子の 95.8%, 陸上植物のコアジーンセット (embryophyte\_odb10) 1614 遺伝子の 96.2 %, 真正双子葉類コアジーンセット (eudicots\_odb10) 2326 遺伝子の 95.7% が含まれていた (表 1-11, 1-12, 1-13).

‘LA1673’ では緑色植物亜界のコアジーンセットの 96.5%, 陸上植物コアジーンセットの 96.5%, 真正双子葉類 コアジーンセット (eudicots\_odb10) の 95.7% が含まれていた

(表 1-11,1-12,1-13). 以上より, 'LA1670', 'LA1673' が高い完成度の参照ゲノムを得ることができたと結論づけた.

#### 1-3-1-4 発現遺伝子分析

かずさ DNA 研究所の白澤健太博士により, 'LA1670' および 'LA1673' から構築した 808.8 Mb および 804.5 Mb の参照ゲノム配列について, MAKER パイプラインを用いたタンパク質コード領域の予測が行われた. その結果, 'LA1670' で 71945 個, 'LA1673' で 75230 個のタンパク質コード領域が予測され, データの提供を受けた (表 1-10).

次に, 実際に生体内で発現のある遺伝子を検証するために, 'LA1670' および 'LA1673' から 17 の器官の RNA を採取した. illumina により取得した RNA シーケンスデータは 'LA1670' から 112.4 Gb, 'LA1673' から 110.8 Gb で, これを TrimGalore によりトリミングし, 'LA1670' から 79.7 Gb, 'LA1673' から 78.1 Gb のシーケンシングデータを得た (表 1-14). STAR-RSEM パイプラインを使用して, 参照ゲノムの対応する遺伝子に RNA シーケンスリードをマッピングした結果, 'LA1670' で 97.0%, 'LA1673' で 97.8% の高いマッピング率が得られた (表 1-15).

#### 1-3-1-5 組織特異的な発現遺伝子同定

##### 1-3-1-5-1 'LA1670' の組織特異的な発現遺伝子解析

RSEM によって算出した TPM を発現量とし, アノテーションされた遺伝子が実際に発現するものかを調査した. TPM >0 を発現遺伝子とした場合, *S. pimpinellifolium* 'LA1670' には, 各染色体に 1937 個から 3720 個, 合計 29629 個の発現遺伝子が座乗していた (表 1-16). この発現遺伝子のうち約 20% は, 緑色の果実にも赤色の果実にも発現していなかった (表 1-17). たとえば, *S. l. lycopersicum* の Pathogenesis-related leaf protein とアミノ酸配列の相同性の高い *SPI01g08284.1*, 並びに *S. l. lycopersicum* の WRKY transcription factor のアミノ酸配列と相同性の高い *SPI02g02423.1* は, 果実での発現が全くなく, 根で特に強く発現していた. また, *S. l. lycopersicum* の Wound-induced proteinase inhibitor のアミノ酸配列と高い相同性を示す *SPI09g04534.1* は, 果実で全く発現せず, 葉と花卉で強く発現していた.

葯 (発達中を含む) あるいは花粉にのみ発現が確認された遺伝子として, 2006 個の遺伝子が同定された (表 1-18). 例えば, tomato Profilin-1 のアミノ酸配列と相同性の高い

*SPI06g04222.1*, Squalene synthase のアミノ酸配列と相同性の高い *SPI10g03763.1* は発達中の葯で強い発現が見られ、これらの遺伝子が葯の発達に関与していることが推察された。

#### 1-3-1-5-2 ‘LA1673’ の組織特異的な発現遺伝子解析

*S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ は、各染色体に 1346 個から 3672 個、合計 29,185 個の発現遺伝子が座乗していた (表 1-16)。先行研究では、オレングステージ果実のトランスクリプトーム情報を対象として遺伝子発現の比較と解析が行われていたが、それらが全ゲノム中の遺伝子をどの程度カバーしているか (網羅性) を確かめるために、まず、果実で発現のない遺伝子に着目した (Gao et al., 2019, Wang et al., 2020, Alonge et al., 2020)。その結果、果実 (緑熟, 赤熟) の果実で発現していない遺伝子は発現遺伝子全体の 28% であり、第 12 染色体においては座乗する発現遺伝子のおよそ 3 分の 1 が果実で発現していなかった (表 1-17)。例えば、*SLYcer09g04870.1*, *SLYcer09g00289.1*, *SLYcer07g00364.1*, *SLYcer01g00247.1* が果実で発現しない遺伝子で、それぞれ *S. l. lycopersicum* の Wound-induced proteinase inhibitor 1, Pathogenesis-related leaf protein 4, Metalloprotease inhibitor, Receptor-like protein Cf-9 homolog と高いアミノ酸の相同性を示した。Metalloprotease inhibitor は虫害の応答に関与し、Receptor-like protein Cf-9 homolog は *C. fulvum* という真菌病原体への耐性に関わる。他にも、*S. l. lycopersicum* でテルペンの合成に関わる(R)-linalool synthase TPS5 や Protein EXPRESSION OF TERPENOIDS 1 とそれぞれアミノ酸配列の相同性の高い、*SLYcer01g11029.1*, *SLYcer02g03131.1*, が果実以外の組織で発現していた。これらの遺伝子は、果実の RNA シーケンスデータのみが使用されたこれまでのトマトの pan-genome 解析の PAV 識別において見落とされてきた可能性がある。

さらに、開花期の葯サンプルで発現があるが、花粉で発現のない遺伝子として、‘LA1670’ で 7965 遺伝子、‘LA1673’ で 8655 遺伝子を同定した。これらの遺伝子は、フィラメント、維管束、および/または花粉嚢で発現する遺伝子と考えられた。Probable aquaporin PIP-type pTOM75 のアミノ酸配列と相同性の高い遺伝子 (*SPI08g06241.1*, *SLYcer12g04458.1*) 並びに Agamous-like MADS-box protein AGL8 homolog と相同性の高い遺伝子 (*SPI06g04447.1*, *SLYcer06g04588.1*) が含まれていた。

1-3-2 細胞質雄性不稔系統の遺伝様式の評価

1-3-2-1 F<sub>2</sub>分離比調査による稔性回復様式の推定

[Redacted text block]

1-3-2-2 CMS 系統の葯の表現型観察

[Redacted text block]

[Redacted text block]

1-3-2-3 交雑 F<sub>2</sub> 集団の ddRAD シーケンスによる 'LA1670' の *Rf* 遺伝子座乗領域の推定

[Redacted text block]



### 1-3-3 柱頭露出型 CMS 系統の作出とハチによる採種システムの評価

#### 1-3-3-1 ‘IL2-5’ の利用による柱頭露出型 CMS 系統の作出

##### 1-3-3-1-1 柱頭露出型 CMS 系統の作出

‘IL2-5’ を花粉親, ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ を種子親として, *style2.1* をヘテロ接合型に持つ F<sub>1</sub> 個体 (‘CMS[MSA1]IL2-5\_F1’) を作出した. ‘IL2-5’ から同定された花柱の伸長を引き起こす変異 *style2.1* は顕性と報告されていたことから, F<sub>1</sub> 個体は柱頭が露出すると推測していたが, 実際は柱頭が露出しなかった. そこで, F<sub>1</sub> 個体を種子親, ‘IL2-5’ を花粉親として戻し交雑を行った. BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 個体 (‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC1F1’) は 6 個体のうち 3 個体で全ての花に顕著な柱頭の露出が確認でき, 3 個体では柱頭が露出しない花と露出する花が混在していた. DNA マーカーを用いて *style2.1* 変異の接合型を確認したところ, 顕著に全ての花の柱頭が露出した BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 個体は全て *style2.1* をホモ接合型でもち, F<sub>1</sub> 個体および柱頭が露出する花としない花が混在した BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 個体はすべて *style2.1* をヘテロ接合型に持っていた. そこで, *style2.1* をヘテロ接合型に持つ BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 個体を種子親, ‘IL2-5’ を花粉親として, BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 個体を作成した. DNA マーカーを用いて選抜した *style2.1* をホモ接合型に持つ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 幼苗のみを種子親として育成し, ‘IL2-5’ を花粉親として得た BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 種子 (‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’) をトキタ種苗株式会社へ送付して採種試験を委託実施した. このとき, *style2.1* をホモ接合体に持つ BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 個体, およびそこから得た BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 個体は柱頭が露出した. この結果から, *style2.1* による柱頭露出は必ずしも顕性ではないという可能性が示唆された.

##### 1-3-3-1-2 非柱頭露出型 CMS 系統の作出

比較対象として, 柱頭が露出していない ‘品種 A’ を維持系統として ‘CMS[MSA1]’ に対して 8 回の戻し交雑を行った ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ を作出し, 柱頭が露出しないことを確認した. 維持系統 ‘品種 A’ と ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ の花柱の長さには有意差は見られなかった (図 1-8).

また, ‘M82’ を花粉親, ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ を種子親とした F<sub>1</sub> (‘CMS[MSA1]M82\_F1’) を作出し, 仮説通り柱頭が露出しないことを確認した. 次に, ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC1F1’ のうち, DNA マーカー選抜で *style2.1* をヘテロ接合型に持つと推定された個体を種子親, ‘M82’ を花粉親として, 交雑を行った. 得られた個体に対して DNA マーカーによる選抜を行い, *style2.1* を持たない個体を育成した. この

*style2.1* を持たない個体を種子親, 'M82' を花粉親とした BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 個体 ('CMS[MSA1]M82\_BC3') を作出し, トキタ種苗株式会社に送付して採種試験を委託実施した.

### 1-3-3-1-3 CMS 系統における *style2.1* の遺伝子型ごとの表現型観察

各遺伝型の個体について, 花の形態を観察し, 実体顕微鏡下で花柱の長さを計測した. その結果, *style2.1* を持たない 'CMS[MSA1]M82\_F1', 'CMS[MSA1]M82\_BC3' では柱頭が葯に覆われていた. その傾向は 'CMS[MSA1]M82\_F1' よりも 'M82' の遺伝背景の強い 'CMS[MSA1]M82\_BC3' の方が強く, 'CMS[MSA1]M82\_BC3' は 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8' と花柱の長さに有意差がなかった (図 1-9 A). 一方, 柱頭の露出に着目すると, *style2.1* をヘテロ接合型に持つ 'CMS[MSA1]IL2-5\_F1' では, 柱頭が出る花と出ない花が混在しており, 花柱の長さは 'CMS[MSA1]M82\_F1' と有意差が生じなかった. また, *style2.1* をホモ接合体にもつ 'CMS[MSA1]IL2-5\_BC3' は, 全ての花の柱頭が顕著に露出しており, 花柱の長さも *style2.1* を持たない 'CMS[MSA1]M82\_F1', 'CMS[MSA1]M82\_BC3', 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8', と比べて有意に長かった (図 1-9 B).

### 1-3-3-1-4 *style2.1* 変異の顕性/半顕性の調査

'CMS[MSA1]IL2-5\_F1' の個体において, 柱頭が露出する花と露出しない花が混在したことから, *style2.1* 変異が半顕性である可能性が示唆された. そのため, 'M82' と 'IL2-5' を交配した F<sub>1</sub> 個体 ('M82xIL2-5\_F1') を作出し, 形態観察と花柱の長さの測定を行った. その結果, 花柱の長さの統計では 'IL2-5', 'M82xIL2-5\_F1' とともに 'M82' と比べて有意に長く, *style2.1* は花柱の伸長について顕性の遺伝子変異であることが示された (図 1-10 A). 一方, 花の形態観察を行うと, 'IL2-5' は全ての花で柱頭が露出したのに対し, 'M82xIL2-5\_F1' では柱頭が露出する花と露出しない花が混在した (図 1-10 B). 'M82xIL2-5\_F1' では, 'IL2-5' に比べて葯の先端がすぼんでおらず開いている傾向があった. このことから, 柱頭の露出は *style2.1* による花柱の伸長のみでは引き起こされず, 葯の形態の影響も受ける可能性が示唆された.

### 1-3-3-2 ‘品種 B’ の利用による柱頭露出型 CMS 系統の作出

柱頭露出型 CMS 系統を作出することを目的に、‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ に対して、実用品種かつ柱頭の露出する ‘品種 B’ を花粉親とした 3 回の戻し交雑を行い BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> 個体を作成した。初回の交雑で得られた F<sub>1</sub> 個体（‘CMS[MSA1]品種 B\_F1’）は、柱頭が露出せず、‘品種 B’ の柱頭露出は潜性の遺伝子によることが示唆された。また、DNA マーカーを用いて *style2.1* の有無を確認したところ、‘品種 B’ は *style2.1* を持たず、*style2.1* とは異なる遺伝子による柱頭露出であることが示された。

‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ は ‘品種 B’ と同様に、全ての花で柱頭が顕著に露出した。実体顕微鏡下で花柱の長さを測ったところ、非柱頭露出型系統 ‘品種 A’ で ‘CMS[MSA1]’ を 8 回戻し交雑した個体（‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’）は、維持系統と比較して花柱の長さに有意差が生じなかったのに対して、‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ は維持系統 ‘品種 B’ と比較して有意に花柱が伸長していた。戻し交雑の回数が 3 回と少ないので、花柱の長さの有意差は遺伝背景の影響によるものである可能性が示唆された (図 1-11)。

### 1-3-3-3 ハチによる採種可能性の検証 (予備実験)

柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC2’ の複数の花の雄蕊に数ミリの茶色の跡があり、ハチによる訪花を示すバイトマークであると示唆された (図 1-12)。また、共同研究者の松澤佑馬氏により、ハチの訪花が目視で確認された。果実形成後に採種し種子数を計数したところ、100 果実に対して 1289 粒の F<sub>1</sub> 種子を得た。バイトマークおよび種子生産を確認できたことから、花粉を生産するトマト CMS 系統にはハチが訪花することが示された。

### 1-3-3-4 ハチによる採種効率の検証 (本実験)

#### 1-3-3-4-1 非柱頭露出型 CMS 系統の採種試験結果

非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ を種子親として、技術者による手交配で F<sub>1</sub> 採種を行った結果、12 株あたり合計 4731 粒の F<sub>1</sub> 種子が採種された。このとき、1 株当たりの果実は 5 個に制限され、平均果実重は 217.9 g であった。一果実あたりの採種数は 79 粒、1 株あたりの採種数は 394.2 粒であった。一方、この CMS 系統を種子親としてハチによる交配で F<sub>1</sub> 種子を採種した結果、12 株あたり合計 6 粒の F<sub>1</sub> 種子が

採種された。果実は 2 個得られ、平均果実重は 125.0 g であり手交配と比べて顕著に種子数、果実数、果実重が減少した。一果実あたりの採種数は 3 粒、1 株あたりの採種数は 0.5 粒であった。一果実あたりの採種数は手交配と比べて 4%、一株あたりの採種数は 0.1%程度に低下した (表 1-20, 図 1-13)。

同様に、非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’ を種子親として、技術者による手交配で F<sub>1</sub> 採種を行った結果、6 株あたり合計 3023 粒の F<sub>1</sub> 種子が採種された。このとき、果実は 76 個得られ、平均果実重は 84.8 g であった。一果実あたりの採種数は 40 粒、1 株あたりの採種数は 503.9 粒であった。一方、この CMS 系統 6 株を種子親としてハチによる交配で F<sub>1</sub> 採種を行った結果、採種数の合計は 0 粒であった。果実も全く得ることができなかった。また、‘CMS[MSA1]M82\_BC3’ 同様に *style2.1* を持たず、かつ ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ により近い遺伝子型を持つ非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]M82\_F1’ についても、6 株を種子親として栽培し、ハチを用いた F<sub>1</sub> 採種を行った。その結果、得られた果実は 0 個で、採種数の合計も 0 粒であった (表 1-21, 図 1-13)。

#### 1-3-3-4-2 柱頭露出型 CMS 系統の採種試験結果

柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ を種子親として、技術者による手交配で F<sub>1</sub> 採種を行った結果、12 株あたり合計 2121 粒の F<sub>1</sub> 種子が採種された。このとき、果実は単為結果果実を含めて 189 個得られ、平均果実重は 15.7 g であった。一果実あたりの採種数は 11 粒、1 株あたりの採種数は 176.7 粒であった。一方、この CMS 系統を種子親としてハチによる交配により F<sub>1</sub> 採種を実施した結果、12 株あたり合計 2241 粒の F<sub>1</sub> 種子が採種された。果実は単為結果果実を含めて 293 個得られ、平均果実重は 11.9 g であった。一果実あたりの採種数は 8 粒、1 株あたりの採種数は 186.8 粒であった。手交配と比べて一果実あたりの種子数は 73%に減少したものの、採種された合計種子数と 1 株あたりの採種数はともに 106%に、着果した果実数果実数は 155%に増加した (表 1-22)。平均果実重の減少は、果実中の種子数が少ないことに起因すると考えられた。

同様に、柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’ を種子親として、技術者による手交配で F<sub>1</sub> 採種を行った結果、6 株あたり合計 1875 粒の F<sub>1</sub> 種子が得られた。このとき、果実は 41 個得られ、平均果実重は 42.9 g であった。一果実あたりの採種数は 46 粒、1 株あたりの採種数は 312.6 粒であった。一方、この CMS 系統を種子親としてハチによ

る交配で F<sub>1</sub> 種子を採種した結果、6 株あたり合計 456 粒の F<sub>1</sub> 種子が採種された。果実は 28 個得られ、平均果実重は 30.4 g であった。一果実あたりの採種数は 16 粒、1 株当たりの採種数は 76 粒であった。手交配と比べて、採種された合計種子数は 24% に減少した。一果実あたりの採種数は 35% に、1 株当たりの採種数は 24% に減少した (表 1-23, 図 1-13)。

以上より、非柱頭露出型 CMS 系統ではハチによる交配で採種数が大幅に減少したのに対し、柱頭露出型 CMS 系統ではハチによる交配でもある一定の採種数が得られることが示された。

#### 1-3-3-4-3 採種コストの算出と比較

トキタ種苗株式会社の松澤氏により、柱頭露出型系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ を用いた採種を例として、ハチによる交配と手交配に要したコストが算出された。手交配を行った技術職員の作業時間は 20.5 時間で、圃場のある埼玉県での最低賃金で換算した場合に 18,983 円のコストがかかったと算出された。採種された F<sub>1</sub> 種子が 2,121 粒であることから、1 粒あたりの受粉コストは 8.95 円であった。一方、クロマルハナバチを交配に用いた場合、作業時間の代わりにクロマルハナバチ (10 a, 2,000 株用) 1 箱の飼養経費が受粉のコストであり、37,686 円であった。採種された F<sub>1</sub> 種子が 2,241 粒であることから、1 粒あたりの受粉コストは 16.82 円であると算出され、手交配よりも高コストであった。クロマルハナバチを用いた採種が手交配よりも高コストとなった原因として、本研究ではミクروسケールでの試験を採用し、購入したクロマルハナバチの飼育匹数をスケールに合わせて減らす作業を行ったことが挙げられた。1 箱のクロマルハナバチが作業可能である株数は 2,000 株である一方、本研究で温室に栽培した株数は 48 株 (‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’; 12 株, ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’; 12 株, 花粉親系統; 24 株) であったことから、クロマルハナバチの飼養コストを 0.024 倍 (= 48 / 2,000) に補正して採種コストを算出した。その結果、採種試験に用いた 48 株あたりのクロマルハナバチの飼養コストは 904 円であり、1 粒あたりの受粉コストは 0.40 円と算出され、手交配に要した受粉コストを下回った。

#### 1-3-4 第1章の結果のまとめ

本研究では、CMSトマトの稔性を回復する2つのRf系統‘LA1670’(*S. pimpinellifolium*)並びに‘LA1673’(*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*)の参照ゲノムを、ロングリードシーケンス(PacBio Sequel)とショートリードシーケンス(Illumina HiSeq2500)を用いて配列解読し、タンパク質をコードする配列に*in silico*での遺伝子アノテーションを行った。RNAシーケンスを用いた発現解析により、アノテーションされた遺伝子のうちおよそ39%の遺伝子の伝令RNA(messenger RNA, mRNA)への転写が確認された。‘LA1670’並びに‘LA1673’の参照ゲノムはそれぞれ808.8 Mbおよび804.5 Mbであり、これは*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz 1706’の最新の参照ゲノムサイズ782.5 Mb(SL4.0)とほぼ同程度のゲノムサイズであった。さらに、生成されたコンティグをリファレンスに基づいてスキファフォルドを構築した結果、ほとんどのコンティグが*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz 1706’(SL4.0)の染色体にマップされ、スキファフォルドの平均長が57.8 Mbと57.5 Mbの擬似染色体をそれぞれ得た。このスキファフォルドは先行研究により報告されたショートリードベースでの*S. pimpinellifolium*のアセンブル(スキファフォルド平均長 = ~5 kb)と比較して、大きく改善された。さらに構築した参照ゲノム配列の完全性は、それぞれ95.8%、96.5%と高いことがBUSCOにより評価された。加えて、



この中にRf遺伝子の候補遺伝子が含まれると考えられた。

また、‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’を種子親とし、柱頭露出型系統(‘品種 B’, ‘IL2-5’)と非柱頭露出型系統(‘品種 A’, ‘M82’)を花粉親かつ維持系統に用いて、柱頭露出型CMS系統(‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’, ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’)と、非柱頭露出型CMS系統(‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’, ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’)を作出した。ハチによる交配と人為による交配を行い、採種効率を比較した結果、非柱頭露出型CMS系統ではハチによる交配で採種数が大幅に減少したのに対し、柱頭露出型CMS系統ではハチによる交配でもある一定の採種数が得られることが示された。

### 1-3-5 第1章の考察

本研究では、まず、果菜類の CMS を用いた F<sub>1</sub> 採種で必要な Rf 遺伝子の同定に資するべく、Rf 遺伝子を持つとされる 2 つの稔性回復系統 ‘LA1670’ (*S. pimpinellifolium*) 並びに ‘LA1673’ (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) の参照ゲノム構築を行った。

通常、植物ゲノムを完全に正しく組み立てることは、ショートリードを基軸とした第二世代シーケンサーを活用しても反復配列が豊富であるために困難であった。新規の参照ゲノムの構築の精度は、配列解読に用いるシーケンサーとアセンブリに用いる計算アルゴリズムに依存しており、ショートリードベースで参照ゲノムが解読された *S. pimpinellifolium* ‘LA1589’ (Tomato Genome Consortium, 2012) および ‘LA0480’ (Razali et al., 2018) は、スキヤフォールドの平均長が ~5 kb であり、大幅な改善の余地があった。ゲノムの解読の完成度を高めるために必要な条件には、(1)ゲノム配列からリードがむらなく取れること、(2)リード読み取り時のシーケンスエラーが配列非依存的に無作為に生じること、(3)リードの長さがゲノムに存在する反復配列よりも長いことが知られているが、(3)の条件について、植物ゲノムに多数存在する長大な反復配列がショートリードシーケンスのリード長よりも長いために参照ゲノム構築時に複数箇所にマップされてしまうという課題があった (服部ら, 2016)。本研究では、ロングリードシーケンサー (PacBio Sequel) を用いて長大な反復配列よりも長いリードを取得することによってこの課題を解決し、スキヤフォールドの平均長が 57.8 Mb - 57.5 Mb の疑似染色体を得ることに成功した (表 1-9)。このことは ‘LA1589’ と ‘LA0480’ のゲノムで正しく読まれていなかった *S. pimpinellifolium* のゲノム領域について、反復配列、ゲノムの構造多型、SNP よりも長い欠失・挿入・逆位・増幅・転座、ハプロタイプのフェージングなどに関する新たな情報を明らかにする可能性を持つ。一方、Chromosome conformation capture (3C) 法を応用した Hi-C 解析を用いて染色体の三次元的な近接情報を取得することで、DNA のループ構造が司る遺伝子の発現調節等より複雑なメカニズムまで明らかにすることができるが (Feng et al., 2014)、本研究では解析に至らなかった。今後、Hi-C によるゲノム解析を用いて DNA の三次元構造まで明らかにし、構築した参照ゲノムのさらなる高精度化を図れば、Hi-C を用いて構築された *S. pimpinellifolium* ‘LA2093’ の参照ゲノムとの比較を通じて野生種ゲノムの立体構造に関する新たな知見が得られることが期待される。

本研究で構築した参照ゲノムは、緑色植物界、陸上植物、真正双子葉類、それぞれにおいて90%以上の種で単一コピーオーソログとして存在する遺伝子（コアジーン）のデータベースを用いてクエリー配列を検索する BUSCO を用いてアセンブリの完成度が評価された（表 1-11, 1-12, 1-13）。2つの稔性回復系統 ‘LA1670’ (*S. pimpinellifolium*) 並びに ‘LA1673’ (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) に存在する陸上植物のコアジーンの割合は、それぞれ 96.2%と 96.5%であり、SL4.0 に存在する陸上植物のコアジーンの割合 97.5%に迫る高精度な参照ゲノムを得ることができた (Hosmani et al., 2019)。BUSCO による参照ゲノムの完成度の評価は様々な動植物の参照ゲノム構築で用いられているが、近年、転移因子 (transposable element) など非コーディング領域の多様性がもたらす転写産物への影響がトマトでも着目されていることを鑑みると (Dominguez et al., 2020)、非コード領域にも着目した参照ゲノムの完成度評価の必要性が今後高まると推察される。

稔性回復系統である 2つの野生種の高精度な参照ゲノムを構築した本研究の成果は、*Rf* 遺伝子の同定だけでなく、野生種が保有する育種に重要な形質に関するゲノム研究にも資する。野生種トマトのゲノム配列情報の解読は、栽培種トマトと比べて遅延しているが、新規の有用形質をもたらす遺伝子の同定や栽培化の歴史を紐解く手がかりを得るとして、近年、注目を集めている。*S. l. lycopersicum* と *S. l. cerasiforme* の共通の祖先である *S. pimpinellifolium* は、その起源および種の広がりを見せた地域 (エクアドル並びにペルー) の地理的・気候的な多様性が豊富なため、種内の多様性の高さが報告されている (Moyle 2008, Lin 2019, Zuriaga 2009)。*S. pimpinellifolium* は、主に3つの祖先種集団から分化してきたことが分かっており、クラスターである7個のサブポピュレーション (POP S1, S2, S3, M1, M2, M3, M4) に分類することができるが、Hi-C を用いた高精度参照ゲノムが構築された ‘LA2093’ は7個のサブポピュレーションの中でも最も多様性の高い POP S1 の地域帯から採集された (Lin 2019)。*‘LA2093’* および POP S1 のアクセッションは高温多湿のエクアドルで採集されたのに対し、本研究で参照ゲノムを構築した ‘LA1670’ は比較的寒冷かつ乾燥したペルーの南端から採集され POP S3 に属する。このことは ‘LA1670’ と ‘LA2093’ が異なる祖先に由来する亜種団に属することを示しており、各系統の高精度な参照ゲノムの比較により、*S. pimpinellifolium* の多様な種内分化の過程に関する研究に新たな知見をもたらす可能性がある。また、Lin ら (2019) が *S. pimpinellifolium* の多様性をもとに、GWAS を行う時に必要な SNP マーカーの密度を予測した結果、18 kb あたり少なくとも1つの SNP マーカーが存在することが好ましいと



された。一方で、トマトゲノムにおいて 18 kb あたりに 1 つの SNP マーカーを配置するには、50,000 個のマーカーが必要であり、不足しているのが現状である。特にヘテロクロマチン領域において利用可能な SNP マーカーの密度が低く、より高密度な SNP マーカーの開発が求められている。本研究で得られた高精度な参照ゲノムの構築と、他の高精度な参照ゲノムとの比較は、種内に存在する新たな SNP の発見、ひいては SNP マーカーの拡充に寄与する可能性がある。

また、稔性回復系統 'LA1670' と CMS 系統 'CMS[MSA1]品種 A\_BC7' を交配して得られた F<sub>2</sub> 集団において、

[REDACTED]

次に、除雄作業の不要なトマトの F<sub>1</sub> 採種システムの構築に向けて必要な、種子親 CMS 系統の柱頭の露出、および柱頭露出性 CMS 系統のハチ交配による採種効率の調査を行った。柱頭の露出する実用品種 '品種 B' 並びに花柱の伸長する遺伝子変異 *style2.1* を持つ 'IL2-5' の維持系統としての利用により、柱頭の露出する 2 系統の CMS 系統が作出された (図 1-9, 図 1-11)。これら柱頭露出性 CMS 系統を種子親として、クロマルハナバチにより花粉親との交配を行い F<sub>1</sub> 種子を得るモデルを構想し、その実現可能性を検証した。先行研究では、不稔系統と可稔系統を同時に栽培した際に、不稔系統にハチ

が訪花しにくいことが報告されていたが (Gaffney et al. 2019, Erickson 1983), 本研究では, CMS 系統にもハチが訪花することが示された (図 1-12). CMS 系統と種子親に用いた可稔系統それぞれのハチの訪花率の調査は今後の解明が待たれるが, トマトの CMS 系統と訪花昆虫を用いた  $F_1$  種子の採種の実現可能性を示唆する結果を得ることができた. 花粉を産生しない不稔系統へのハチの訪花率が低下した先行研究と比較して, 本研究に用いた CMS 系統が持つ優位性として, 花粉粒の形状や花粉数に大きな差が生じないことが考えられた.

非柱頭露出型 CMS 系統では, 手交配と比較してハチによる交配の  $F_1$  採種数は著しく減少したが, 柱頭露出型 CMS 系統の採種効率にはハチによる交配の採種数の減少が影響を受けにくい傾向にあった (表 1-20, 表 1-21, 表 1-22, 表 1-23, 図 1-13). これは柱頭の露出により, 自家の不稔花粉が柱頭を覆いにくくなったことと, クロマルハナバチの体表面に付着した花粉親由来の花粉が柱頭に付着しやすくなったことに起因することが考えられた. また, 柱頭露出型 CMS 系統のうち, ハチによる交配で採種性が高まった系統 'CMS[MSA1]品種 B\_BC3' と低まった系統 'CMS[MSA1]IL2-5\_BC3' があった. その原因については, 維持系統の香気成分の違いによるハチの嗜好性の違いや, ハチの引き寄せに関する視覚的なシグナルであるガイドマークの強さの違い, 柱頭の大きさによる採種効率の違いが影響した可能性が考えられた.

また, 花柱の伸長をもたらす *style2.1* 変異は先行研究により顕性であると報告されており, 本研究の結果からも *style2.1* 変異をヘテロ接合型に持つ個体の花柱の伸長により顕性であることが支持されたが, 柱頭露出の形質は *style2.1* 変異をヘテロ接合型に持つ個体においては形質が安定しないことが判明した. 原因として, 柱頭露出が花柱の長さだけでなく葯の形態にも影響を受けることが一因であると考えられた. 特に, 葯の先端が反る花と内側に巻き込む花では柱頭露出の程度が異なることから (図 1-10), 遺伝的バックグラウンドの影響を受ける形質である可能性が示唆された. 実用化を見据えると, *style2.1* 変異をヘテロ接合型に持つ個体では柱頭が露出する花と露出しない花が混在したが,  $F_1$  品種における柱頭の露出は自殖効率の低下ひいては着果不良をもたらすため,  $F_1$  採種の種子親の柱頭露出は潜性の遺伝子変異により制御されていることが望ましい. これに対して, 国内の民間種苗会社で既に親系統として用いられている '品種 B' の柱頭露出は潜性であることが示唆されており,  $F_1$  品種でも安定した自殖が可能である.

そのため、‘品種 B’に柱頭露出をもたらす遺伝子変異の同定と DNA マーカーの開発は、効率的な F<sub>1</sub> 種子生産の実用化に寄与する可能性がある。

本研究では、トマトの F<sub>1</sub> 採種における省力化とコスト低減を目標とし、‘CMS[MSA1] 品種 B\_BC3’を用いた F<sub>1</sub> 採種にて要した受粉コストを算出した。その結果、手交配では 1 粒あたりの受粉コストが 8.95 円であるのに対し、マルハナバチを交配に用いた場合では 16.82 円であった。しかし、本研究では、実験に用いるマルハナバチの最小単位である 1 箱あたりの作業株数よりも少ない株数を栽培したマイクロスケールでの採種試験を行ったために、1 株あたりのマルハナバチの飼養経費が割高についてしまった可能性があり、スケールアップした場合のコストは検証の余地が残る。本研究で算出した理論値では、1 粒あたりの受粉コストが 0.40 円にまで低下した。このことから、柱頭露出型 CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 採種が採種の省力化とコスト低減に寄与する可能性は十分に考えられ、今後、より規模を拡大しての採種効率の調査が必要である。

#### 1-4 図表

表 1-1. 第 1 章に用いたソフトウェアの一覧

Name	Version	Reference or source of the software
ALLMAPS	0.7.3	Tang, H., Zhang, X., Miao, C., et al. 2015. ALLMAPS: robust scaffold ordering based on multiple maps. <i>Genome Biol.</i> 16, 3.
Arrow	2.2.2	Implemented in SMRT Link v5.0 (PacBio)
Augustus	3.0.3	Stanke, M., Keller, O., Guinduz, I., Hayes, A., Waack, S. and Morgenstern, B. 2006, AUGUSTUS: ab initio prediction of alternative transcripts. <i>Nucleic Acids Res.</i> 34, W435-436
BUSCO	3.0.2	Simao, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V. and Zdobnov, E. M. 2015, BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. <i>Bioinformatics</i> , 31, 3210-3212.
D-Genes		Cabarlettes, F. and Klopp, C. 2018, D-GENIES: dot plot large genomes in an interactive, efficient and simple way. <i>PeerJ</i> , 6, e4958.
Falcon-unzip	1.8	Chin, C. S., Peluso, P., Sedlazeck, F. J., et al. 2016, Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing. <i>Nat Methods</i> , 13, 1050-1054.
FASTX-Toolkit	0.0.13	<a href="http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit">http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit</a>
Jellyfish	2.2.6	Marcals, G. and Kingsford, C. 2011, A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. <i>Bioinformatics</i> , 27, 764-770.
Minimap2	2.17	Li, H. 2018, Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. <i>Bioinformatics</i> , 34, 3094-3100.
Trim_galore	0.62	<a href="http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/">http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/</a>
Repbase		Jurka, J., Kapronov, V. V., Ravitsk, A., Klonowski, P., Klotz, O., Wachenwitz, J. 2002, Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. <i>Lyogenet. Genomic Res.</i> 11(6) 462-467
SAMtools	0.1.19	Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., et al. 2009, The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. <i>Bioinformatics</i> , 25, 2078-2079.
ptlon	1.23	Bruce, J.W., Abeel, T., Shea, T., Prest, M., Abooneli, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., Earl, A.M. 2014, Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. <i>PLoS ONE</i> , 19, e112963.
RSEM	1.3.1	Li, B., Dewey, C.N. 2011, RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. <i>Bioinformatics</i> , 12, Article number: 323
FASTQC		Andrews S. 2010, FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <a href="http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc">http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc</a>
bcftools	1.8	<a href="http://samtools.github.io/bcftools/">http://samtools.github.io/bcftools/</a>
RaGOO		Alonge, M., Soyk, S., Ramakrishnan, S., et al. 2019, RaGOO: fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. <i>Genome biology</i> , 20(1), 1-17.
Maker		Campbell, M. S., Holt, C., Moore, B. and Yandell, M. 2014, Genome annotation and curation using MAKER and MAKER - P. Current protocols in bioinformatics, 48(1), 4-11.
SNAP		Johnson, A. D., Handsaker, R. E., Pritchard, S. L., Nizzari, M. M., O'Donnell, C. J. and De Bakker, P. I. 2008, SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. <i>Bioinformatics</i> , 24(24), 2938-2939
SortMeRNA	2	Kopylova, E., Noé, L. and Touzet, H. 2012, SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. <i>Bioinformatics</i> , 28(24), 3211-3217.

(Takei et al., 2021)

表 1-2. 葎サンプリング前の 12 日間の気温と日照時間

日付	気温(°C)			日照時間 (h)
	平均	最高	最低	
1	21.2	26.6	16.3	10.6
2	22.4	28.2	18.5	11.4
3	23.2	29.4	17	11.8
4	23.4	29.4	17.6	13.3
5	23.5	28.6	18	7.3
6	20.8	22.7	19	0
7	23.4	29.9	18.4	10.6
8	24.3	29.8	17.9	9.3
9	26	32.8	20.4	8.4
10	19	20.5	17.5	0
11	19.1	21.2	17.3	0
12	20.2	24.2	18.3	0.2
13	22.1	28.4	18	8.7

埼玉県久喜市の 2018 年 6 月の日ごとの平均気温, 最高気温, 最低気温と日照時間を示す。サンプリングは 6 月 13 日に行った。値は気象庁ホームページ ([https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/daily\\_a1.php?prec\\_no=43&block\\_no=0359&year=2018&month=6&day=13&view=](https://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/daily_a1.php?prec_no=43&block_no=0359&year=2018&month=6&day=13&view=)) より引用した。灰色でハイライトした日付は、サンプリング実施日を示す。

表 1-3. 組織固定時の脱気サイクル

ステップ	時間(分)	ゲージ圧(Mpa)
1	45	-0.06 ~ -0.1
2	15	0
3	45	-0.06 ~ -0.1
4	15	0
5	45	-0.06 ~ -0.1
6	15	0
7	45	-0.06 ~ -0.1
8	一晩	0

FAA による組織固定時の脱気サイクルを示す。常にサンプルが十分に覆われる量の固定液に浸漬した。また、偶数番号のステップ毎に固定液を交換した。

表 1-4. 組織固定に用いた溶液

名称	組成	浸漬回数
FAA 溶液	ホルマリン[formalin] 5% / 水酢酸[acetic acid] 5% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 63% / 水 27%	5
ブチアルコールシリーズ 1 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 10% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 40% / 水 50%	1
ブチアルコールシリーズ 2 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 20% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 50% / 水 30%	1
ブチアルコールシリーズ 3 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 35% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 50% / 水 15%	1
ブチアルコールシリーズ 4 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 55% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 45%	1
ブチアルコールシリーズ 5 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 75% / エチルアルコール[ethyl alcohol] 25%	1
ブチアルコールシリーズ 6 液	t-ブチアルコール[tert-butyl alcohol] 100%	3

組成はいずれも容積比. 水はオートクレープ処理で滅菌した蒸留水を用いた.

表 1-5. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ より得られたシーケンスデータの統計

Sequencing type	Read length(bp)	Reads		Bases (Gb)	
		Before	After	Before	After
illumina HiSeq 2000	150	326,523,884	256,435,728	112.4	79.7
PacBio Sequel	>10000	5,558,092		86.8	

ショートリードシーケンサー illumina HiSeq 2000 により取得されたリードは TrimGalore による処理の前 (Before) と後 (After) の統計を示す. (Takei et al., 2021)



表 1-6. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ より得られたシーケンスデータの統計

Sequencing type	Read length(bp)	Reads		Bases (Gb)	
		Before	After	Before	After
illumina HiSeq 2000	150	331,830,407	235,667,319	110.8	78.1
PacBio Sequel	>10000	4,931,190		77.6	

ショートリードシーケンサー illumina HiSeq 2000 により取得されたリードは TrimGalore による処理の前 (Before) と後 (After) の統計を示す. (Takei et al., 2021)

表 1-7. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の修正前のコンテイング統計

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’
N50 (bp)	10,119,361	9,478,482
L50	24	21
N60 (bp)	8,226,607	8,392,046
L60	33	30
N70 (bp)	6,166,144	6,753,289
L70	44	40
N80 (bp)	4,109,631	4,680,801
L80	60	54
N90 (bp)	2,273,512	2,681,313
L90	86	76
Number of contigs	244	201
Largest contig (bp)	36,305,789	68,894,119
Smallest contig (bp)	21,255	23,004
Average contig length (bp)	3,314,667	4,002,321
Total length (bp)	808,778,754	804,466,445

(Takei et al., 2021)

表 1-8. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の修正後のコンテイング統計

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’ (SPI_r1.1)a	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’ (SLYcer_r1.1)b
N50 (bp)	10,119,361	9,478,482
L50	24	22
N60 (bp)	8,226,607	8,392,046
L60	33	31
N70 (bp)	6,166,144	6,753,289
L70	44	41
N80 (bp)	4,109,631	4,680,801
L80	60	55
N90 (bp)	2,273,512	2,681,313
L90	86	77
Number of contigs	244	202
Largest contig (bp)	36,305,789	44,614,784
Smallest contig (bp)	21,255	23,004
Average contig length (bp)	3,314,667	3,982,507
Total length (bp)	808,778,754	804,466,445

a; DDBJ accession numbers BMBV01000001-BMBV01000244

b; DDBJ accession numbers BMBW01000001-BMBW01000202

として DDBJ データベースに登録した. (Takei et al., 2021)

表 1-9. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の擬似染色体スキヤフォルドの統計

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’
N50 (bp)	66,552,494	66,823,253
L50	6	6
N90 (bp)	49,929,902	48,343,254
L90	11	11
Number of scaffolds	14	14
Largest scaffold (bp)	97789368 (SPI1.1ch01)	118650774 (SLYcer1.1ch01)
Smallest scaffold (bp)	1449357(SPI1.1Unknown)	61018 (SLYcer1.1Unknown)
Average scaffold length (bp)	57,771,554	57,463,225
Total length (bp)	808,801,754	804,485,145

*S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の擬似染色体 SPI\_r1.1pmol および, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の擬似染色体 SLYcer\_r1.1pmol の統計を示す. 最も長いスキヤフォルドはそれぞれ SPI1.1ch01 と SLYcer1.1ch01 であり, 最も短いスキヤフォルドはそれぞれ SPI1.1Unknown と SLYcer1.1Unknown であった. (Takei et al., 2021)

表 1-10. *S. pimpinellifolium* 'LA1670' と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' の擬似染色体の構成

Chromosome*	<i>S. pimpinellifolium</i> 'LA1670'					<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> 'LA1673'					<i>S. lycopersicum</i> var. <i>lycopersicum</i> 'Heinz1706' (SL4.0 ITAG4.0)					
	#contigs	(%)	Contig size(bp)	(%)	#genes	(%)	#contigs	(%)	Contig size(bp)	(%)	#genes	(%)	Sequence length(bp)	(%)	#genes	(%)
Ch00	32	13.1	6,197,042	0.8	4,544	6.3	37	18.4	9,678,733	1.2	6,727	8.9	9,643,250	1.2	513	1.5
Ch01	18	7.4	97,789,368	12.1	8,859	12.3	11	5.5	94,371,439	11.7	8,618	11.5	90,863,682	11.6	4,133	12.1
Ch02	14	5.7	49,861,979	6.2	4,789	6.7	8	4	54,091,648	6.7	5,863	7.8	53,473,368	6.8	3,379	9.9
Ch03	20	8.2	65,162,952	8.1	5,662	7.9	17	8.5	66,823,253	8.3	5,558	7.4	65,298,490	8.3	3,324	9.8
Ch04	9	3.7	65,616,834	8.1	5,625	7.8	13	6.5	67,222,826	8.4	6,029	8	64,459,972	8.2	2,819	8.3
Ch05	24	9.8	75,079,728	9.3	5,018	7	10	5	57,125,772	7.1	3,376	4.5	65,269,487	8.3	2,382	7
Ch06	9	3.7	49,929,902	6.2	5,439	7.6	10	5	48,343,254	6	5,578	7.4	47,258,699	6	2,769	8.1
Ch07	23	9.4	74,519,832	9.2	6,430	8.9	23	11.4	72,923,569	9.1	5,786	7.7	67,883,646	8.7	2,517	7.4
Ch08	11	4.5	68,510,109	8.5	6,471	9	7	3	70,551,588	8.8	6,557	8.7	63,995,357	8.2	2,428	7.1
Ch09	24	9.8	71,053,701	8.8	5,001	7	15	7.5	68,740,419	8.5	5,308	7.1	68,513,564	8.8	2,521	7.4
Ch10	12	4.9	60,610,119	7.5	4,537	6.3	14	7	72,371,102	9	6,070	8.1	64,792,705	8.3	2,520	7.4
Ch11	12	4.9	56,468,337	7	4,336	6	19	9.5	55,383,786	6.9	4,268	5.7	54,379,777	6.9	2,326	6.8
Ch12	34	13.9	66,552,494	8.2	5,186	7.2	16	8	66,796,838	8.3	5,274	7	66,688,036	8.5	2,444	7.2
Unknown	2	0.8	1,449,357	0.2	48	0.1	2	1	61,018	0	218	0.3		0		0
Total	244	100	808,801,754	100	71,945	100	202	100	804,485,245	100	75,230	100	782,520,033	100	34,075	100

列 "Chromosome" (Ch00 から Ch12 まで) は, *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* 'Heinz1706' (SL4.0) の第0染色体 (Solyco0) から第12染色体 (Solyco12) までにそれぞれ対応する, *S. pimpinellifolium* 'LA1670' の SPI00 から SPI12 までと, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' の SLYcer00 から SLYcer12 までを示す. Unknown は *S. pimpinellifolium* 'LA1670' あるいは *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' のコンテナイグのうち, *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* 'Heinz1706' (SL4.0) のどの染色体にもマップされなかったコンテナイグから構成される. 列 "#contig" はそれぞれの染色体にマップされたコンテナイグの本数を示す. 列 "#gene" は, それぞれの擬似染色体にアノテーションされた遺伝子数を示す. (Takei et al., 2021)

表 1-11. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ and *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の構築した参照ゲノムの包含する緑色植物のコアジーンセットの割合

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’
Complete BUSCOs (%)	95.8	96.5
single-copy BUSCOs (%)	94.4	95.1
duplicated BUSCOs (%)	1.4	1.4
Fragmented BUSCOs (%)	2.4	2.1
Missing BUSCOs (%)	1.8	1.4
Total BUSCO groups	425	425

Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (v. 4) によって構築した参照ゲノムが含む緑色植物界のコアジーンセットの割合を算出した. (Takei et al., 2021)

表 1-12. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ and *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の構築した参照ゲノムの包含する陸上植物のコアジーンセットの割合

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’
Complete BUSCOs (%)	96.2	96.5
single-copy BUSCOs (%)	94.8	95.1
duplicated BUSCOs (%)	1.4	1.4
Fragmented BUSCOs (%)	1.2	1.1
Missing BUSCOs (%)	2.6	2.4
Total BUSCO groups	1,614	1,614

Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (v. 4) によって構築した参照ゲノムが含む陸上植物のコアジーンセットの割合を算出した。

表 1-13. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ and *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の構築した参照ゲノムの包含する真正双子葉類のコアジーンセットの割合

	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’
Complete BUSCOs (%)	95.7	95.7
single-copy BUSCOs (%)	94.6	94.5
duplicated BUSCOs (%)	1.1	1.2
Fragmented BUSCOs (%)	0.7	1.0
Missing BUSCOs (%)	3.6	3.3
Total BUSCO groups	2,326	2,326

Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs (BUSCO) (v. 4) によって構築した参照ゲノムが含む真性双子葉植物のコアジーンセットの割合を算出した。



表 1-14. 組織別の RNA シーケンスにより得られたデータ量

Sample tissue	<i>S. pimpinellifolium</i> 'LA1670'	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> 'LA1673'
Anther (Bud size: 3 mm-4 mm)	4,460,481,826	4,537,242,419
(Bud size: 4 mm-5 mm)	5,136,989,112	5,248,448,532
(Bud size: 5 mm-6 mm)	4,590,323,307	5,108,968,691
(Bud size: 6 mm-7 mm)	4,590,109,792	4,717,626,357
(Bud size: 7 mm-8 mm)	4,328,994,589	4,495,729,328
(Bud size: 8 mm-9 mm)	5,174,160,613	4,688,265,223
(Anthesis stage flower)	5,144,532,994	4,810,221,399
Calyx	4,831,635,684	4,907,116,749
Fruit (Green)	6,614,398,106	1,883,281,609
(Red)	4,484,793,451	4,367,399,704
Leaf	4,475,182,984	5,030,724,896
Ovary	4,388,275,407	4,902,423,089
White petal before anthesis	4,522,528,785	6,171,825,656
Yellow petal on anthesis stage	4,615,076,002	4,626,789,659
Pollen	2,457,852,858	2,271,544,347
Root	4,639,220,304	6,009,508,095
Stem	5,257,756,226	4,306,088,293
#Sum (bp)	79,712,312,040	78,083,204,046
#Sum (Gbp)	80	78

(Takei et al., 2021)

表 1-15. RNA シーケンスにより得られたリードの器官別の参照配列へのマップ率

Sample tissues	<i>S. pimpinellifolium</i> 'LA1670'	<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> 'LA1673'
Anther (Bud size: 3 mm-4 mm)	98.16	98.61
(Bud size: 4 mm-5 mm)	98.21	98.56
(Bud size: 5 mm-6 mm)	97.96	98.53
(Bud size: 6 mm-7 mm)	97.81	98.43
(Bud size: 7 mm-8 mm)	97.73	97.96
(Bud size: 8 mm-9 mm)	97.67	97.94
(Anthesis stage flower)	97.41	97.78
Calyx	98.17	98.31
Fruit (Green)	95.45	98.33
(Red)	89.9	94.04
Leaf	98.34	98.24
Ovary	98.02	97.71
White petal before anthesis	97.67	98.44
Yellow petal on anthesis stage	98.28	98.16
Pollen	96.5	96.92
Root	93.77	96.46
Stem	97.89	98.34
Average (%)	97.00	97.81

(Takei et al., 2021)

表 1-16. *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ で発現が確認された遺伝子数

Chromosome	<i>S. pimpinellifolium</i> ‘LA1670’		<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> ‘LA1673’	
	#genes	(%)	#genes	(%)
Ch00	20	0.1	37	0.1
Ch01	3,720	12.6	3,672	12.6
Ch02	2,906	9.8	2,896	9.9
Ch03	2,915	9.8	2,943	10.1
Ch04	2,528	8.5	2,467	8.5
Ch05	2,179	7.4	1,346	4.6
Ch06	2,537	8.6	2,505	8.6
Ch07	2,210	7.5	2,182	7.5
Ch08	2,174	7.3	2,101	7.2
Ch09	2,265	7.6	2,192	7.5
Ch10	2,102	7.1	2,836	9.7
Ch11	1,937	6.5	1,908	6.5
Ch12	2,129	7.2	2,100	7.2
Unknown	7	0.0	0	0.0
Total	29,629	100.0	29,185	100.0

列 "Chromosome" (Ch00 から Ch12 まで) は, *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz1706’ (SL4.0) の第 0 染色体 (Soly00) から第 12 染色体 (Soly12) までにそれぞれ対応する, *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ の SPI00 から SPI12 までと, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の SLYcer00 から SLYcer12 までを示す. Unknown は *S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ あるいは *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ のコンテイングのうち, *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz1706’ (SL4.0) のどの染色体にもマップされなかったコンテイングから構成される. 列 "#genes" は, RNA シーケンスに用いた 17 の器官のうち, 少なくとも 1 つの器官で発現 (TPM > 0) が確認された遺伝子数を示す. (Takei et al., 2021)

表 1-17. *S. pimpinellifolium* 'LA1670' と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' の果実  
で発現の観察されなかった遺伝子数

Chromosome	<i>S. pimpinellifolium</i> 'LA1670'			<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> 'LA1673'		
	#genes	(%)	percentage of genes on same chromosome (%)	#genes	(%)	percentage of genes on same chromosome (%)
Ch00	3	0.05	15.00	20	0.25	54.05
Ch01	697	12.10	18.74	1,152	14.25	27.02
Ch02	428	7.43	14.73	645	7.98	22.27
Ch03	486	8.44	16.67	728	9.01	24.75
Ch04	495	8.59	19.58	690	8.54	28.12
Ch05	517	8.98	23.73	428	5.30	31.80
Ch06	443	7.69	17.46	656	8.12	26.14
Ch07	436	7.57	19.73	643	7.96	29.35
Ch08	434	7.53	19.96	409	5.06	27.12
Ch09	475	8.25	20.97	616	7.62	28.10
Ch10	470	8.16	22.36	888	10.99	31.46
Ch11	382	6.63	19.72	518	6.41	27.16
Ch12	491	8.52	23.06	689	8.53	32.81
Unknown	3	0.05	42.86	0	0.00	0.00
Total	5,760	100	19.44	8,082	100	27.71

表 1-18. *S. pimpinellifolium* 'LA1670' と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' の蒴あるいは花粉のみ発現の観察された遺伝子数

Chromosome	<i>S. pimpinellifolium</i> 'LA1670'			<i>S. lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i> 'LA1673'		
	#genes	(%)	percentage of genes on same chromosome (%)	#genes	(%)	percentage of genes on same chromosome (%)
Ch00	1	0.05	5.00	12	0.44	32.43
Ch01	272	13.56	7.31	397	14.69	9.31
Ch02	144	7.18	4.96	194	7.18	6.70
Ch03	126	6.28	4.32	214	7.92	7.27
Ch04	191	9.52	7.56	230	8.51	9.37
Ch05	195	9.72	8.95	187	6.92	13.89
Ch06	129	6.43	5.08	176	6.51	7.01
Ch07	164	8.18	7.42	216	7.99	9.86
Ch08	154	7.68	7.08	123	4.55	8.16
Ch09	186	9.27	8.21	237	8.77	10.81
Ch10	157	7.83	7.47	288	10.65	10.20
Ch11	133	6.63	6.87	186	6.88	9.75
Ch12	152	7.58	7.14	243	8.99	11.57
Unknown	2	0.10	28.57	0	0.00	0.00
Total	2,006	100	6.77	2,703	100	9.27

表 1-19. *S. pimpinellifolium* 'LA1670' の *Rf* 遺伝子座として同定された領域内で雄性器官に発現のある遺伝子のリスト

非公表

非公表

非公表



非公表

非公表

桃色でハイライトした遺伝子はペンタトリコペプチドリピートプロテインを示す. gene id; 遺伝子名, anther3\_4, anther4\_5, anther5\_6, anther6\_7, anther7\_8, anther8\_9; 蕾の長さが 3-4 mm, 4-5 mm, 5-6 mm, 6-7 mm, 7-8 mm, 8-9 mm の葯, anther\_op; 開花日の葯, calyx; 萼, fruit\_gr; 緑色果実, fruit\_re; 赤熟果実, leaf; 葉, ovary; 子房, petal\_wh; 開花前日の白色花弁, petal\_ye; 開花当日の黄色花弁, pollen; 花粉, root; 根, stem; 茎, MAX; 全器官での遺伝子発現量 (TPM) の最大値, Male\_max; 雄性器官での遺伝子発現量 (TPM) の最大値.

表 1-20. 非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A BC8’ の採種効率調査結果

	合計種子数	植物あたり果実数	果実あたり種子数	植物体あたり種子数
ハチによる交配	6	0.2	3	0.5
手交配	4731	5	79	394.2
増加率(%)	0.13	3.33	3.80	0.13

それぞれの交配手法について、各 12 個体を採種効率の調査に用いた。増加率(%)は手交配による採種数を基準として、ハチ交配による種子数の比率を百分率で示す。青色のハイライトは、ハチによる交配で手交配よりも減少したことを示す。

表 1-21. 非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’ の採種効率調査結果

	合計種子数	植物あたり果実数	果実あたり種子数	植物体あたり種子数
ハチによる交配	0	0	0	0
手交配	3023	12.7	40	503.9
増加率(%)	0	0	0	0

それぞれの交配手法について、各 6 個体を採種効率の調査に用いた。増加率(%)は手交配による採種数を基準として、ハチ交配による種子数の比率を百分率で示す。青色のハイライトは、ハチによる交配で手交配よりも減少したことを示す。

表 1-22. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ の採種効率調査結果

	合計種子数	植物あたり果実数	果実あたり種子数	植物体あたり種子数
ハチによる交配	2241	24.4	8	186.8
手交配	2121	15.75	11	176.7
増加率(%)	105.66	155.03	72.73	105.72

それぞれの交配手法について、各 12 個体を採種効率の調査に用いた。増加率(%)は手交配による採種数を基準として、ハチ交配による種子数の比率を百分率で示す。青色のハイライトは、ハチによる交配で手交配よりも減少したことを示す。桃色のハイライトは、ハチによる交配で手交配よりも増加したことを示す。

表 1-23. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’ の採種効率調査結果

	合計種子数	植物あたり果実数	果実あたり種子数	植物体あたり種子数
ハチによる交配	456	4.7	16	76
手交配	1875	6.8	46	312.6
増加率(%)	24.32	68.29	34.78	24.31

それぞれの交配手法について、各 6 個体を採種効率の調査に用いた。増加率(%)は手交配による採種数を基準として、ハチ交配による種子数の比率を百分率で示す。青色のハイライトは、ハチによる交配で手交配よりも減少したことを示す。

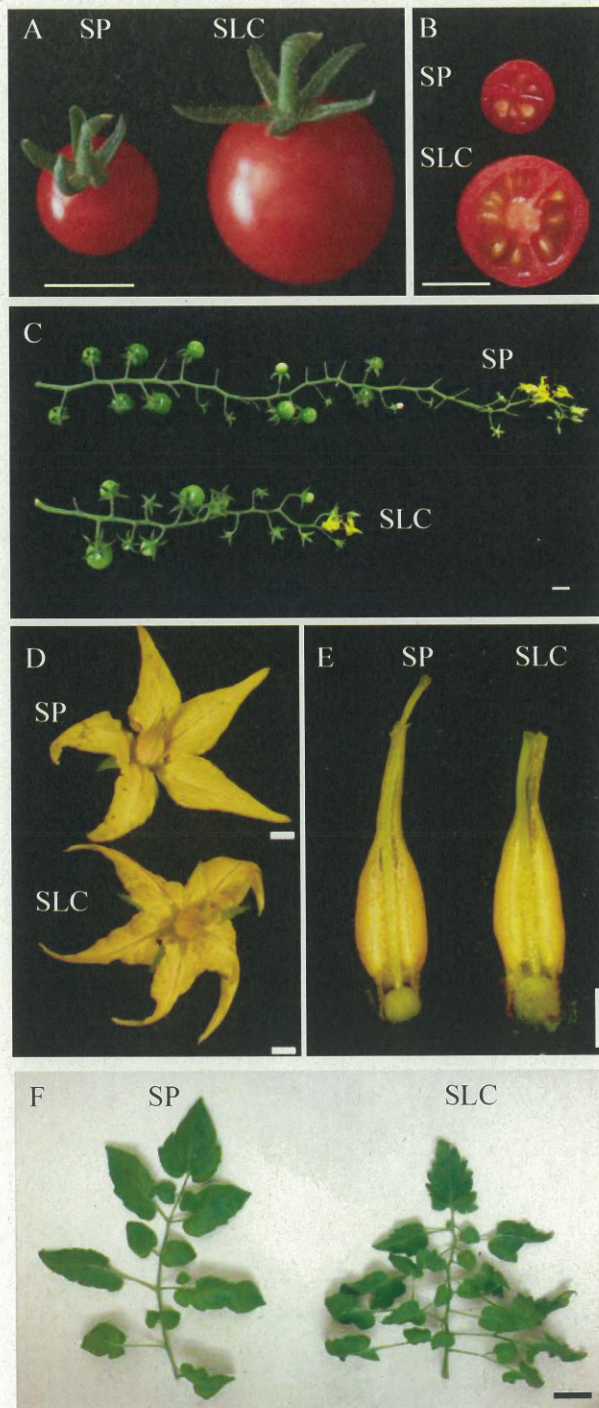


図 1-1. 本研究に供試した稔性回復系統の表現型

*S. pimpinellifolium* ‘LA1670’ と *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ‘LA1673’ の (A) 果実, (B) 果実横断面 (C) 花序, (D) 花, (E) 雄蕊の縦断面と雌蕊, (F) 成熟した葉, の形態. SP, *S. pimpinellifolium*, SLC, *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*. スケールバー = 1 cm (A,B,C); 2 mm (D,E), 5 cm (F) (Takei et al., 2021)

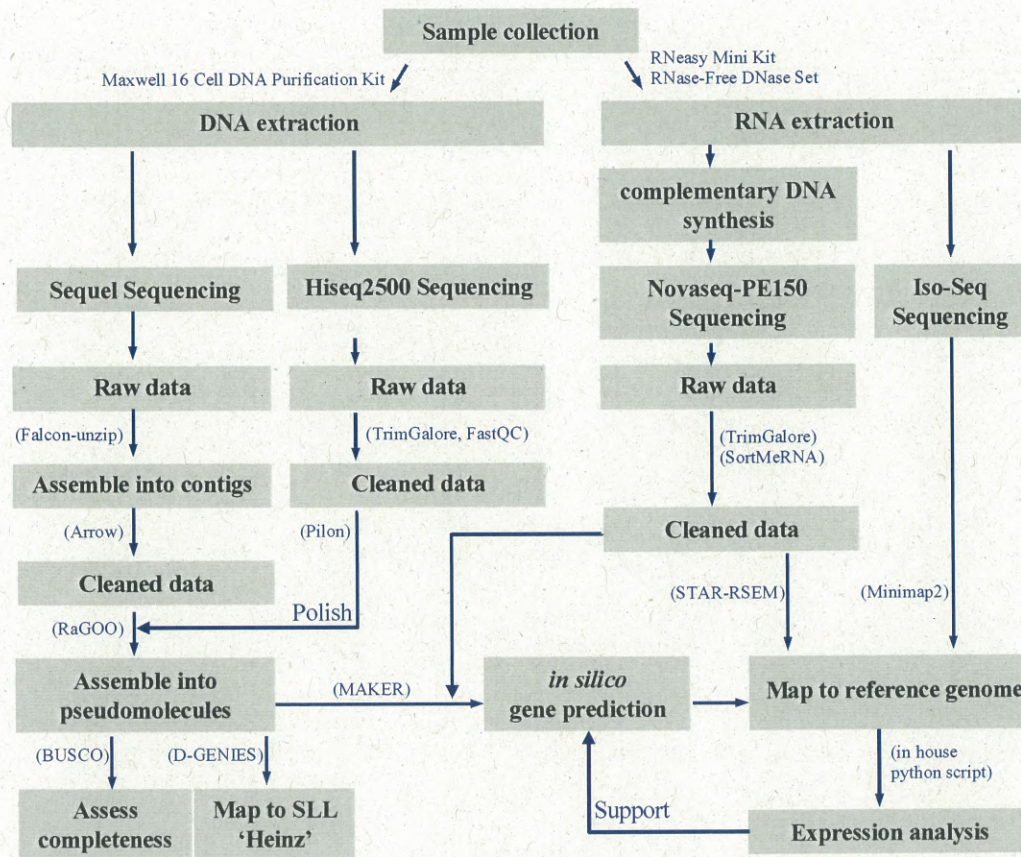


図 1-2. 参照ゲノム構築のフローチャート模式図

植物組織から全ゲノム DNA および RNA を抽出した。DNA はロングリードシーケンサーとショートリードシーケンサーによる配列解読の為にライブラリ作成後、PacBio Sequel および illumina Hiseq2500 を用いて配列情報の解読を行った。Sequel で取得された配列はコンティグにアッセンブルされたのち、Arrow でエラーを補正し、Hiseq2500 で取得されたリードで研磨を行い、擬似染色体の構築が行われた。構築した擬似染色体を用いて、*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* 'Heinz1706' (SL4.0) へのマッピングと BUSCO による完成度の評価を行った。また、構築した擬似染色体の配列に対して、MAKER を用いた遺伝子予測を行った。一方、RNA シーケンスで取得したデータは rRNA のリードを除去したのち、構築した擬似染色体上の予測遺伝子にマップされた。マップされたデータを用いて組織特異的な遺伝子の発現解析を行った。

(Takei et al., 2021)



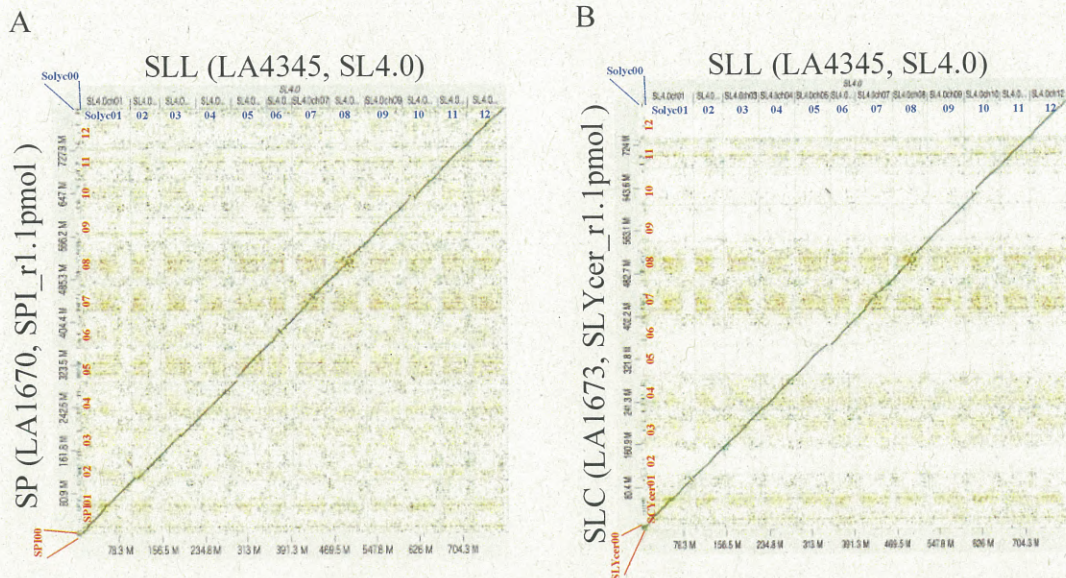


図 1-3. 構築した 2 系統の参照ゲノムと *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* 'Heinz 1706' (SL4.0) のドットプロット比較

(A) SP 'LA1670' (SPI\_r1.1pmol) を SLL 'Heinz 1706' (SL4.0) にマッピングした結果. (B) SLC 'LA1673' (SLYcer\_r1.1pmol) を SLL 'Heinz 1706' (SL4.0) にマッピングした結果. SLL 'Heinz 1706' (SL4.0) 参照ゲノムの Solyc00 から Solyc12 までに、それぞれ SP 'LA1670' の SPI00 から SPI12 まで、SLC 'LA1673' の SLYcer00 から SLYcer12 まで、がマップされた. 横軸に青で示した整数は、染色体の番号を示す. 縦軸に赤で記した整数は、構築した参照ゲノムにおける擬似染色体の番号を示す. SLC; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, SP; *S. pimpinellifolium*, SLL; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*. (Takei et al., 2021)

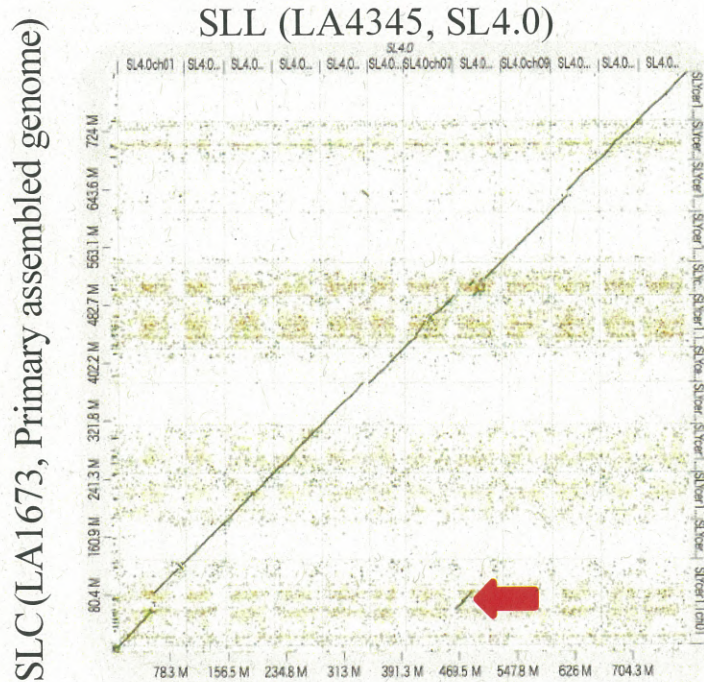
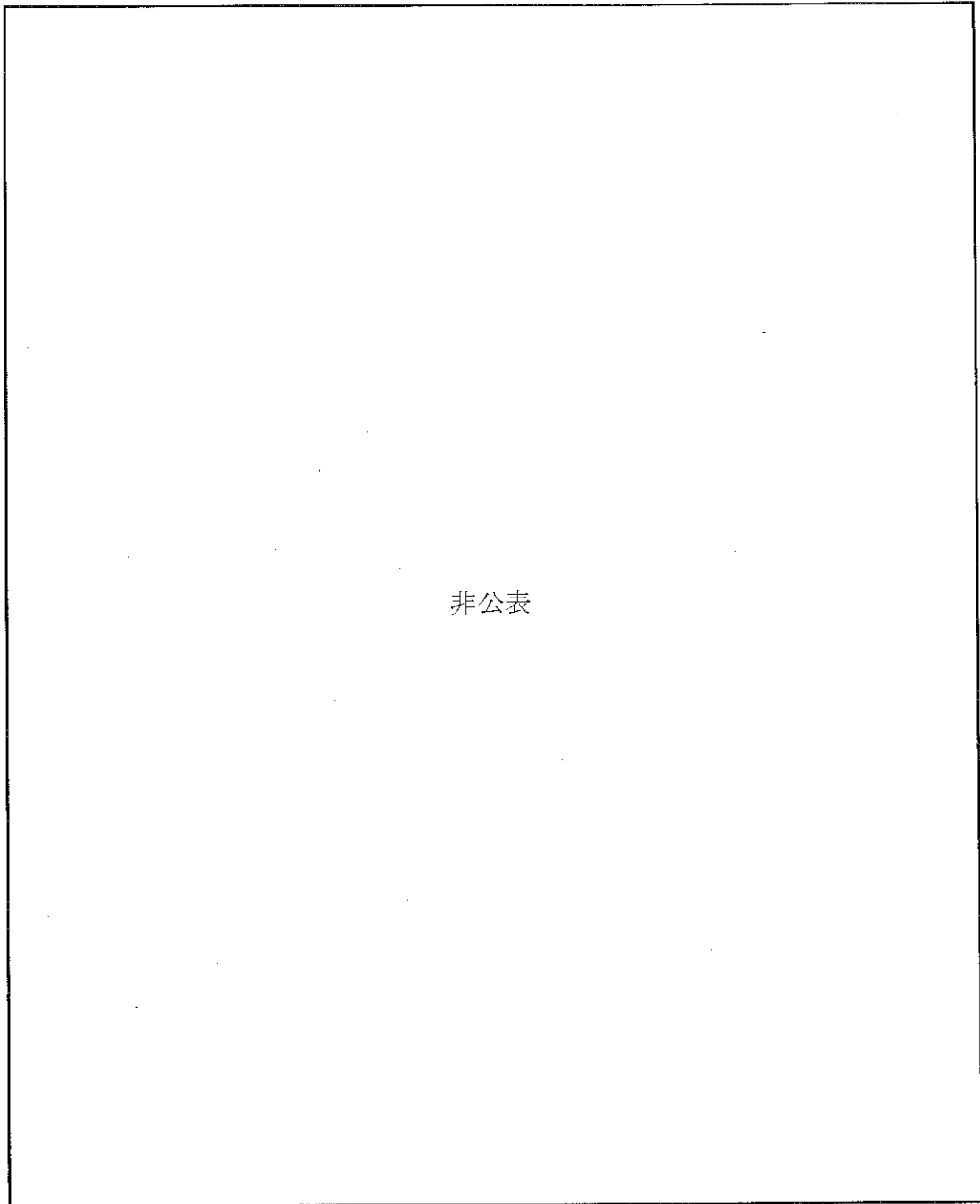


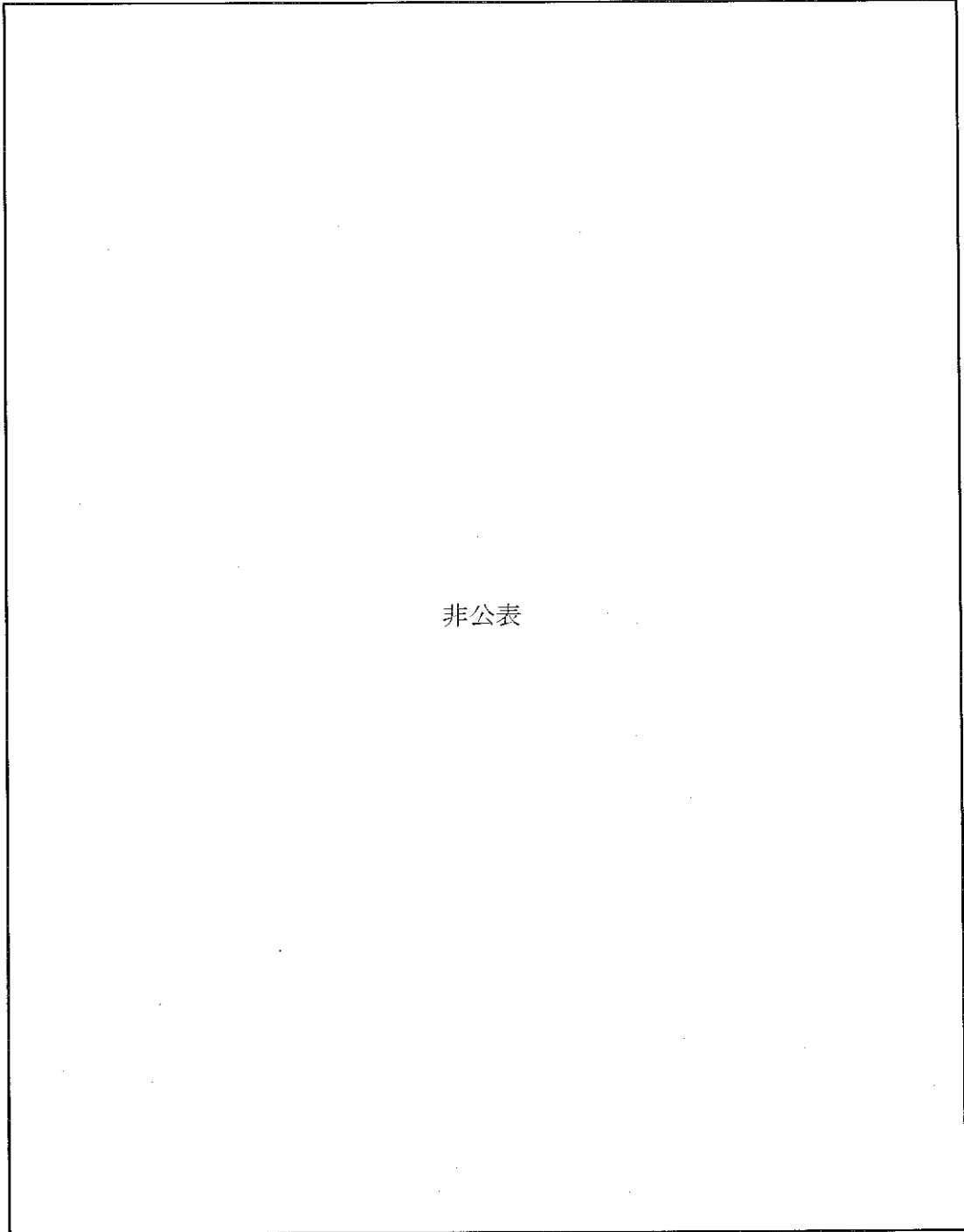
図 1-4. *S. lycopersicum cerasiforme* の第一アセンブルコンティグと *S. l. lycopersicum* のドットプロット比較  
 SLC ‘LA1673’から取得したリードをアセンブルして得たコンティグから擬似染色体を構築し、D-GENIES を用いて SLL ‘Heinz 1706’ (SL4.0) にマップした。矢印は、SLC ‘LA1673’の第 1 染色体上の一部の配列が、SLL ‘Heinz 1706’ (SL4.0) の第 8 染色体の配列と高い相同性を示した領域を指す。‘Heinz 1706’ (SL4.0) 参照ゲノムの Solyc00 から Solyc12 までに、SLC ‘LA1673’ の SLYcer00 から SLYcer12 まで、の対応する擬似染色体がマップされた。SLC; *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, SLL; *S. lycopersicum* var. *lycopersicum*. (Takei et al., 2021)



非公表

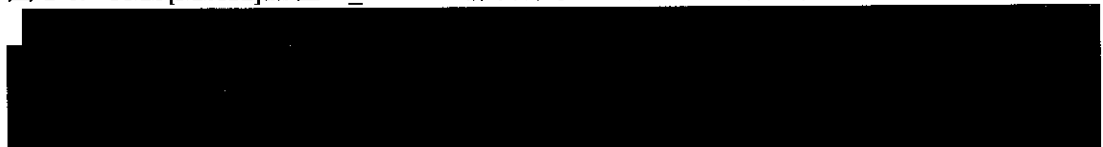
図 1-5. 種子をつけない個体の受粉 1 日後の柱頭のアニリンブルー染色





非公表

図 1-6. 'CMS[MSA1]品種 A\_BC7' と維持系統 '品種 A' の葯組織の横断面の比較



赤矢印はタペート細胞を示す。

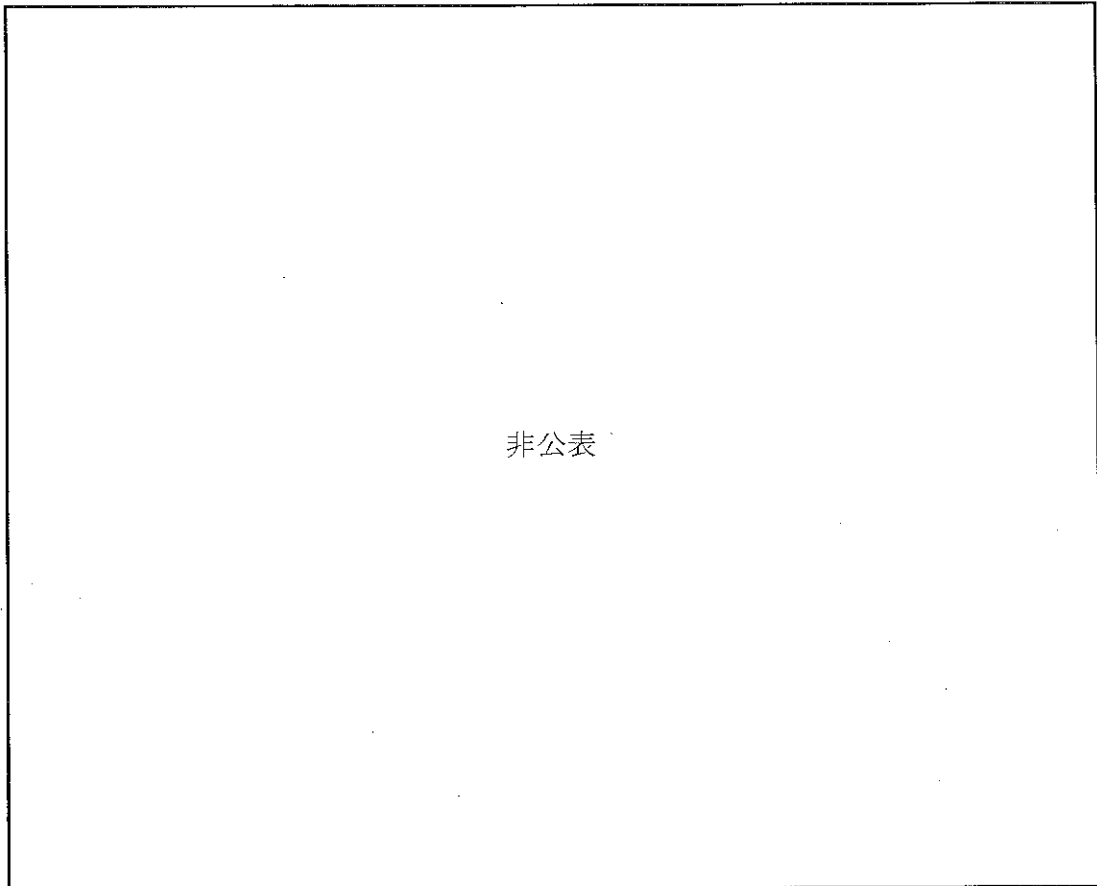
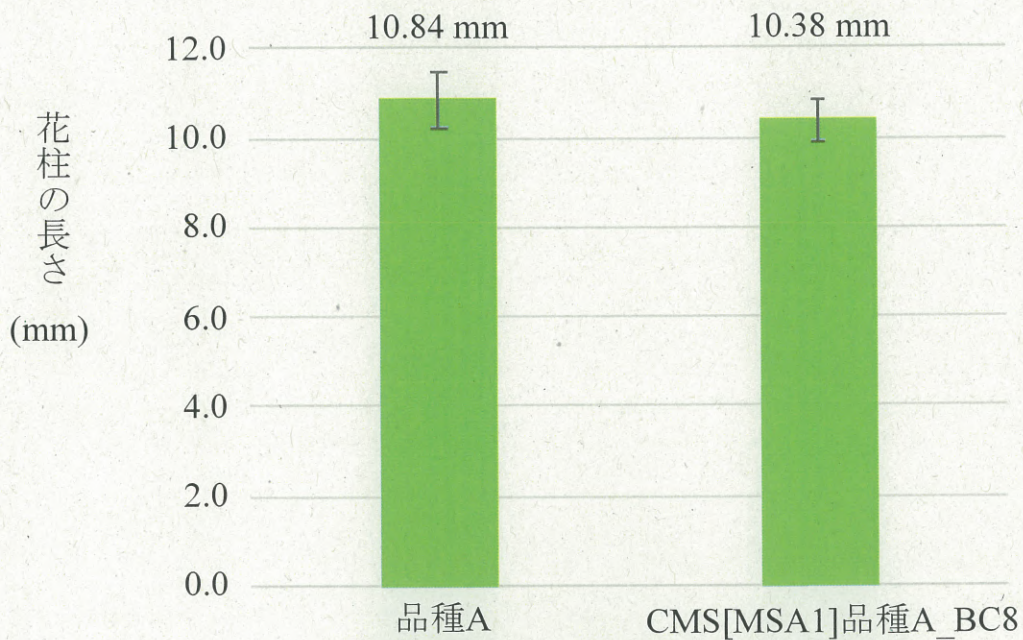


図 1-7. F<sub>2</sub> 集団全個体の ddRAD シーケンスから得られた SLL 型のアレル頻度



(A)



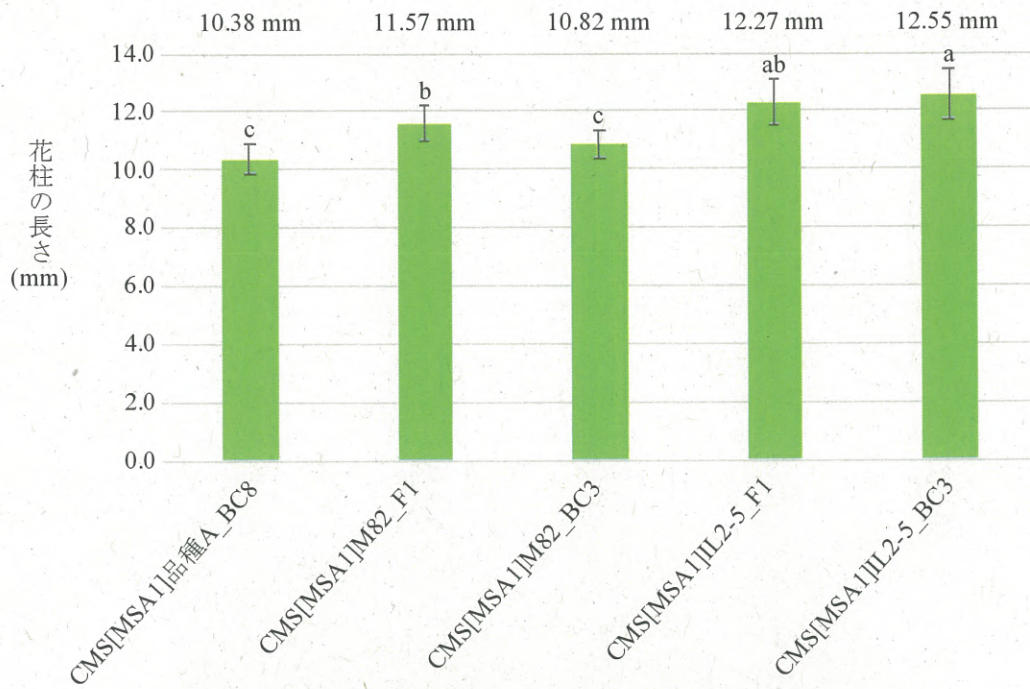
(B)



図 1-8. 非柱頭露出型 CMS 系統'CMS[MSA1]品種 A\_BC8'の雌蕊と雄蕊

(A) 維持系統 '品種 A' と 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8' の花柱の長さの比較, (B) 葯の縦断面の実体顕微鏡写真. 維持系統 '品種 A' と 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8' の花柱の長さに有意差は見られず, 柱頭露出の形質が維持系統の表現型に従った CMS 系統が作出された. スケールバー = 2 cm. (Student の  $t$  検定,  $p < 0.05$ )

(A)

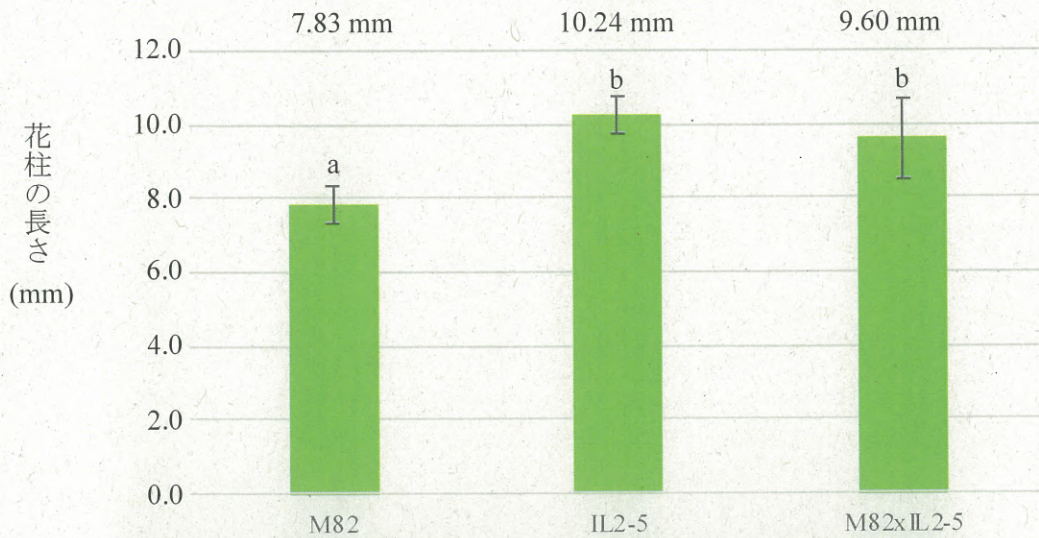


(B)



図 1-9. 'M82' および 'IL2-5' との交配により作出した CMS 系統との雌蕊と雄蕊  
(A) 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8', 'CMS[MSA1]M82\_F1', 'CMS[MSA1]M82\_BC3', 'CMS[MSA1]IL2-5\_F1', 'CMS[MSA1]IL2-5\_BC3', の花柱の長さ. 異なるアルファベットは花柱の長さの有意差を示す. (ボンフェローニ法による多重検定,  $p < 0.05$ )  
(B) 左から順に, 1; 'CMS[MSA1]品種 A\_BC8', 2; 'CMS[MSA1]M82\_F1', 3; 'CMS[MSA1]M82\_BC3', 4; 'CMS[MSA1]IL2-5\_F1', 5; 'CMS[MSA1]IL2-5\_BC3' の葯の縦断面の実体顕微鏡写真. スケールバー = 2 cm.

(A)



(B)



図 1-10. 'M82' と 'IL2-5' の交配により作出した F<sub>1</sub> 植物の雌蕊と雄蕊

(A) 'M82', 'IL2-5', および 'M82' と 'IL2-5' を親系統として得られた F<sub>1</sub> 個体の花柱の長さ. 異なるアルファベットは花柱の長さの有意差を示す. (ボンフェローニ法による多重検定,  $p < 0.05$ )

(B) 'M82', 'IL2-5', および 'M82' と 'IL2-5' を親系統として得られた F<sub>1</sub> 個体の代表的な花の雌蕊と雄蕊の構造を示す実体顕微鏡写真. F<sub>1</sub> 個体では, 株内に, (1) 柱頭が露出する花と, (2) 柱頭が露出しない花が混在した. スケールバー = 2 cm.



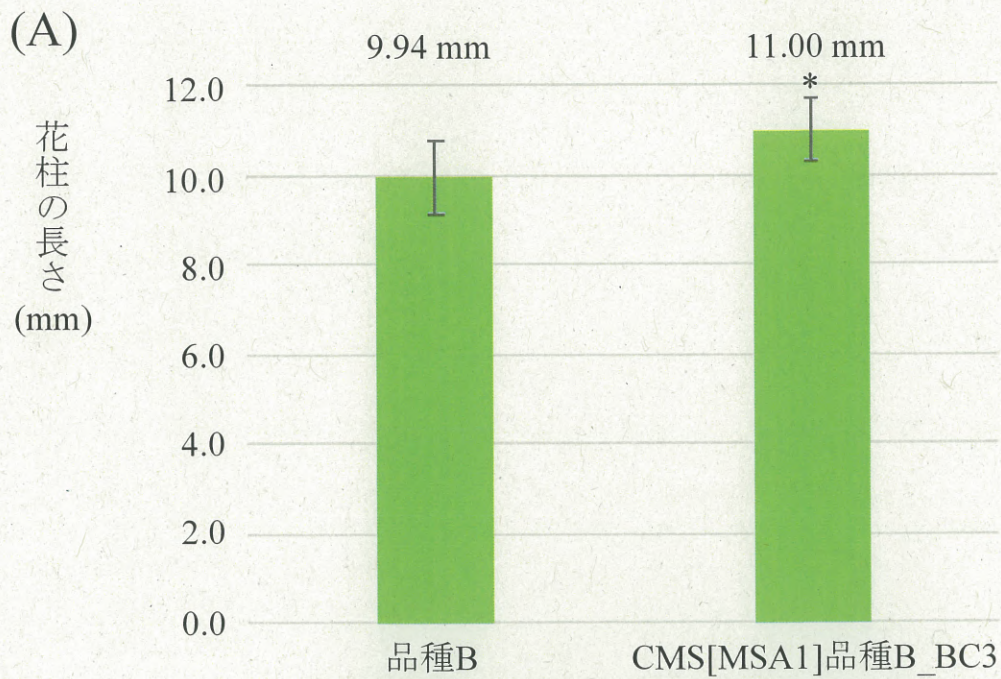


図 1-11. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ の雌蕊と雄蕊  
 (A) 維持系統 ‘品種 B’ と ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ の花柱の長さの比較, および(B)  
 葯の縦断面の実体顕微鏡写真. アスタリスクは維持系統 ‘品種 B’ よりも ‘CMS[MSA1]  
 品種 B\_BC3’ は花柱の長さが有意に長かったことを示す (Student の  $t$  検定,  $p < 0.05$ ).  
 柱頭露出の形質が維持系統の表現型に従った CMS 系統が作出された. スケールバー =  
 2 cm.

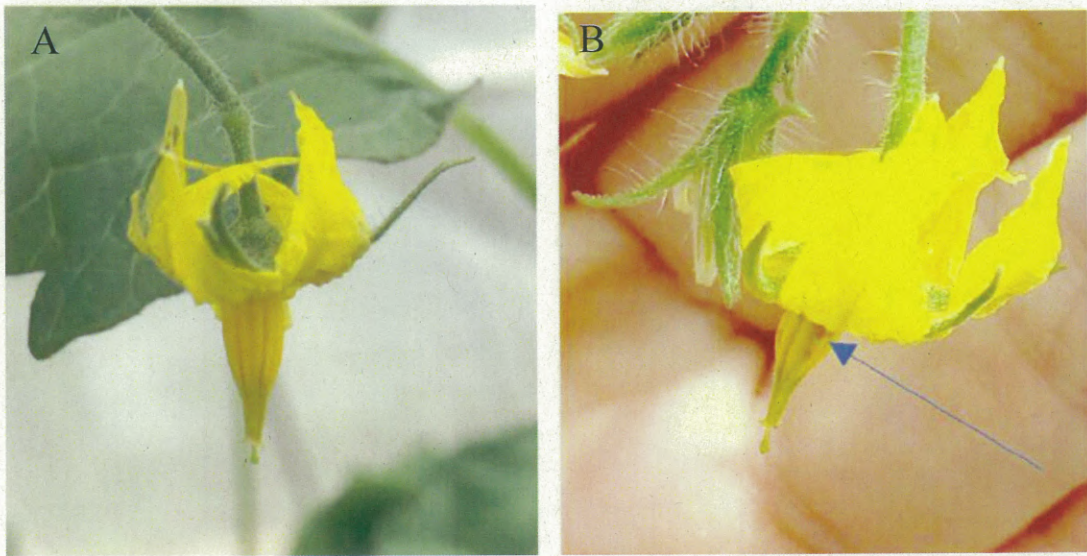


図 1-12. 柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC1’ のクロマルハナバチのバ  
イトマーク  
(A) バイトマークのない花 (B) バイトマークのある花. 葯の一部が褐変するバ  
イトマ  
ークは, クロマルハナバチの訪花の証を示す. 矢印は褐変箇所を示す.

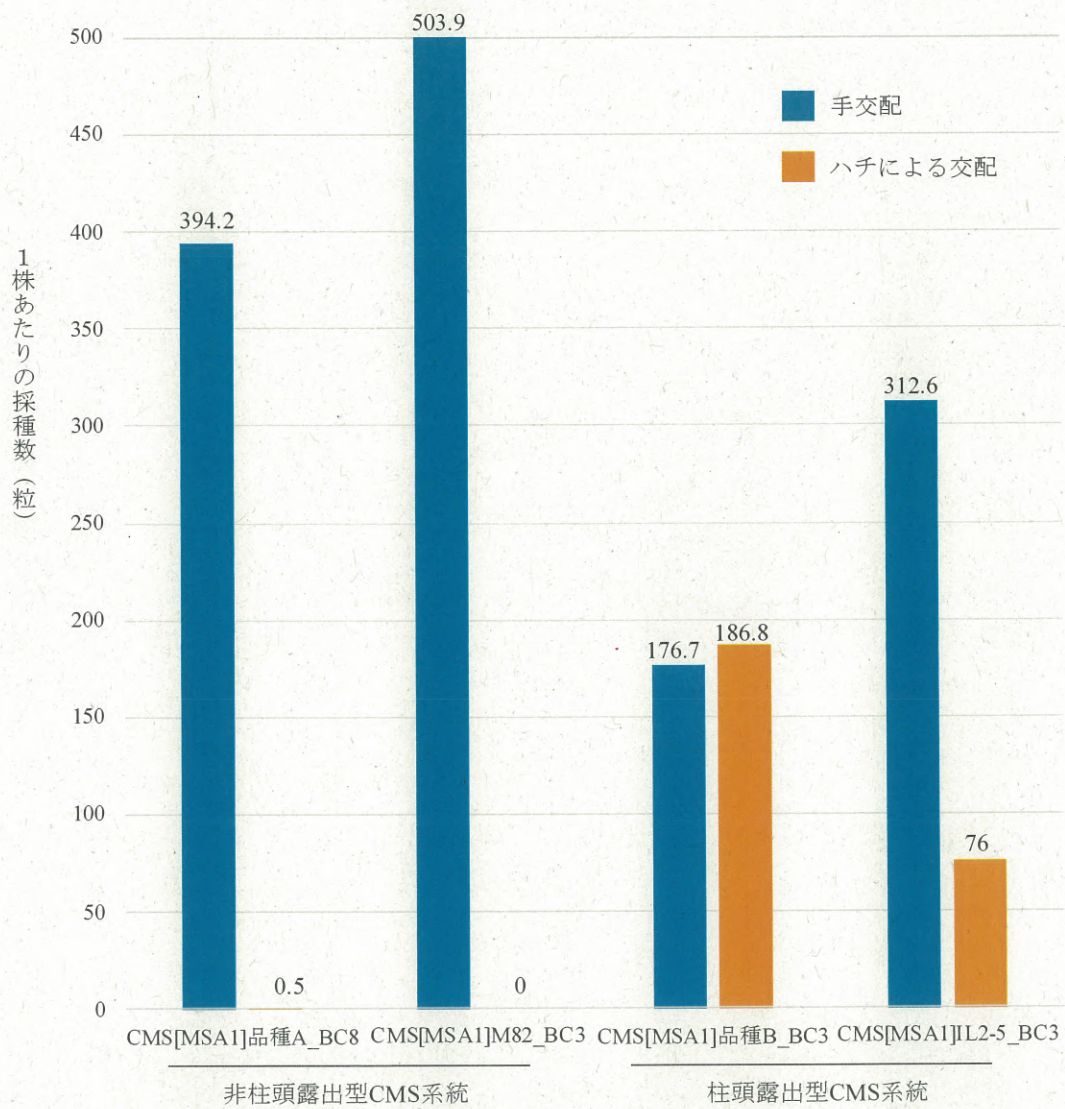


図 1-13. ハチによる交配と手交配における 1 株あたりの F<sub>1</sub> 採種数

非柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’, ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’, および柱頭露出型 CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’, ‘CMS[MSA1]JL2-5\_BC3’ を種子親として採種を行った際に、1 株あたり得られた F<sub>1</sub> 種子の粒数。青色は従来の手交配での採種、橙色はハチによる交配での採種結果を示す。

## 第 2 章

## 第2章 マイクロトムにおける新規単為結果原因遺伝子の同定

### 2-1 緒言

第2章では、受粉不要なトマト生産を可能にする、新規の単為結果性遺伝子の同定とその機能解明を行った。単為結果とは、受粉/受精なしで果実を形成する性質である。トマトに単為結果を引き起こす原因遺伝子は複数同定されているが、不良形質の付随しない新規の単為結果性品種の開発のため、新たな単為結果原因遺伝子の同定や、単為結果メカニズムの解明が求められている。所属研究室の先行研究により、矮性トマト品種‘Micro-Tom’のガンマー線照射由来変異体集団から、小さい単為結果果実を結実する変異体 (TOMJPG4121, *small parthenocarpic fruit and flower (spff)*) が単離された。F<sub>2</sub>集団の分離比より、*spff* 変異体の表現型は単一の潜性遺伝子であることが推定されており、illumina SNP Infinium 解析により原因遺伝子の座上領域が第4染色体上の2つのSNPマーカーによって挟まれる2.6 Mbの領域に限定されていた。この領域内には267個のタンパク質コード遺伝子が含まれており、全ゲノムシーケンスによるマッピングにより、アミノ酸の変化を伴う77個の候補変異と、それらの座乗する46個の候補遺伝子が特定されていた。しかし、46個の遺伝子のうち、どの遺伝子が *spff* 変異体に単為結果をもたらす原因遺伝子なのかは明らかにされていなかった。

本研究では、連鎖解析による原因遺伝子の絞り込みとRNAi法による単為結果性原因遺伝子の検証を行い、その結果、第4染色体上の *Solyc04g077010* にコードされる受容体様タンパク質の機能欠損が単為結果を含む *spff* 変異体の表現型を引き起こしていることを明らかにした。次に、*SPFF* 遺伝子の機能解明のため、*spff* 変異体の栄養器官と生殖器官における表現型の詳細な特徴付けや、未受粉の雌蕊を用いたRNAシーケンスによる網羅的な発現遺伝子解析、相同遺伝子の機能欠損体との表現型の比較等を行った。その結果、花托の維管束細胞での発現量が高い受容体様タンパク質の機能欠損が、ジベレリン合成遺伝子の発現促進やジベレリン不活化遺伝子の発現抑制をもたらし、受粉前の子房細胞の肥大については単為結果を誘導する可能性が示唆された。

### 2-2 材料および方法

#### 2-2-1 植物材料と成長条件

*S. lycopersicum* var. *lycopersicum* の実験用品種 ‘Micro-Tom’ の野生株ならびに *spff* 変異体を栽培室 (筑波大学 生物農林学系 E 棟 505 室、第二エリア 2D 棟 323 室) および温

室 (フランス国立農学研究所 (Institut National de la recherche agronomique, INRA) Bordeaux Aquitaine Centre) において栽培した。DNA シーケンス, 連鎖解析, RNA シーケンス, 並びに RNAi 実験に用いた植物は, 筑波大学の栽培室にてロックウール上で水耕栽培され, 25°C, 16 / 8 時間の明/暗サイクルの環境条件のもと, 大塚 1 号, 大塚 2 号の混合液肥溶液で毎日灌水された。子房細胞の顕微鏡観察, 収量調査, *in situ* hybridization, サフラニン-アストラブルー染色に用いた植物は, INRA の温室にて培養土ポットで栽培され, 環境条件は周囲の温度と自然光の日照に従った。

## 2-2-2 *spff* 変異体の表現型観察

### 2-2-2-1 子房細胞の切片観察

単為結果果実発達初期の *spff* 変異体の子房細胞を観察するため, 開花日の子房の切片作成と顕微鏡観察を行った。手順を以下に記す。

#### 2-2-2-1-1 サンプリングおよび脱気

‘Micro-Tom’ 野生株および *spff* 変異体より開花日かつ未受粉の花を採取し, 直ちに氷上のガラス瓶内で FAA 溶液へ浸した。このとき, FAA 溶液の量が少なすぎない (すべてのサンプルが完全に沈み, FAA がサンプルの水で希釈されない) 量であることに注意を払った。サンプリングの直後に手でガラス瓶を振り FAA 溶液を攪拌することで, 花卉周囲の小さな気泡を取り除いた。実験室に戻った後, 真空ポンプに繋いだデシケータを用いて, 45 分間, -0.06 MPa から -0.1 MPa ゲージ圧下で, 穏やかにサンプル中の気泡を 4 回除去した。このとき, 発生した気泡で FAA 液が突沸しないように留意した。また, 急な減圧により発生した大きな気泡がサンプルを傷つけることのないように, 常にジャンパンの泡程度の小さな気泡が出続ける圧力に調節した。4 回の脱気の合間には, 毎回 FAA 溶液を交換した後, 室温で 15 分間静置した。最後に再び FAA 溶液を交換し, 一晚以上冷蔵庫で静置した (表 1-3)。

#### 2-2-2-1-2 パラフィン置換と包埋

脱気後のサンプルの固定液を t-ブチルアルコールシリーズを用いて置換した (表 1-4)。サンプルを流失しないように気をつけながらガラス瓶を傾け, FAA 溶液を捨てた。少量の t-ブチルアルコールシリーズ 1 液によりサンプルを共洗いした後, 全サンプルが十分

に浸る量の t-ブチルアルコールシリーズ 1 液を注ぎ, 1 日以上静置した. 1 日以上の静置後, 同様の要領で 1 液を捨て, 以降は t-ブチルアルコールシリーズ液による共洗いはせずに, 2 液, 3 液, 4 液, 5 液, 6 液 (6 液のみ 3 回) へと入れ替え, それぞれ 1 日以上静置した. t-ブチルアルコールシリーズ 6 液は 25.69°C で凝固し結晶化するため, 実験時の室温が 25°C を下回る場合には 27°C に温めたインキュベータ内にて静置した. 3 回目の t-ブチルアルコールシリーズ 6 液まで置換後, インキュベータを用いてサンプルの入ったガラス瓶を 60°C に温めた. 一方, パラフィンペレットをビーカーに入れ, 60°C のインキュベータ内で一晩以上かけて融解させた. パラフィン融解後, サンプルの入ったガラス瓶に, 浸漬させている t-ブチルアルコールシリーズ 6 液とほぼ当量の液状パラフィンを流し込んだ. 蓋をせずにおよそ 3 日間インキュベータ内に静置し, t-ブチルアルコールを完全に揮発させた. ガラス瓶を軽く振った際に t-ブチルアルコール特有の樟脳のような臭いがしなくなることを確認を以ってパラフィンへの置換が完了したとみなし, サンプルをパラフィンと一緒にシリコーン製のベーキングカップへ流し込んだ. サンプルが液状パラフィンに沈むのを待って, 切片の向きを考慮しながら, 爪楊枝でサンプルの向きや位置を調整し包埋した.

#### 2-2-2-1-3 切片の作成

パラフィンに包埋したサンプルを, 切片の向きを考慮しながら木片に固定した. 卓上ロータリーマイクロトームを用いて 10  $\mu\text{m}$  厚の連続切片を作成し, ピンセットを用いて切片を蒸留水を滴下したスライドガラスの上に置いた. スライドガラスを伸展器 (42°C) に載せ, パラフィンが十分に進展したタイミングで伸展器から下ろし, キムワイプで水を吸い取った. さらに水を切るため, 指先でスライドガラスの端を持って上腕を力強く振り下ろし, 遠心力を用いてパラフィンとスライドガラスの間の水滴を飛ばした. その後, スライドガラスを伸展器 (42°C) に載せ, 一晩乾燥させた.

#### 2-2-2-1-4 トルイジンブルー染色

切片を貼り付けたスライドガラスを染色カゴに入れ, 0.03% トルイジンブルー液で満たした容器に浸した. 15 分後, 水道水で満たしたビーカーへスライドガラスを速やかに浸し, 余分な水分をキムタオルで吸い取って 3 時間以上風乾させた. その後, ドラフトチャンバー内でスライドガラスを 2 分間キシレンに浸してパラフィンを溶かして除去

した。キシレンから取り出したスライドガラスを、キシレンが揮発する前に平らな場所に置き、エンテランニューを組織サンプル上にスポイトで1滴たらしてカバーガラスで封入した。ドラフトチャンバー内で一晩以上静置し、有機溶媒を完全に揮発させた。

#### 2-2-2-1-5 顕微鏡観察

光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) を用いて切片の観察を行った。顕微鏡観察専用のカメラと顕微鏡用イメージングソフトウェア cellSens Standard を用いて細胞サイズを計測し、細胞層を計数した。Student の *t* 検定を使用して 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の子房の形態の違いを統計的に分析した。

#### 2-2-2-2 発芽率の調査

'Micro-Tom' 野生株および *spff* 変異体より、開花日の午前中の花粉を 1 mL の液体花粉発芽培地 (1.6 mM ホウ酸, 1 mM 塩化カルシウム, 0.52 M スクロース, 1 mM 硝酸カルシウム, 1 mM 硫酸マグネシウム, 0.01mM Tris-HCl, pH 7.0) に採取した。室温で 16 時間のインキュベーション後、光学顕微鏡で花粉を観察した。花粉管の長さが花粉の直径の 2 倍以上の花粉を発芽花粉とし、発芽率を下記の式で求めた。

$$\text{発芽率} = \text{顕微鏡視野内の発芽花粉数} / \text{顕微鏡視野内の花粉総数}$$

野生株および *spff* 変異体について生物学的反復を 3 回行った。技術的反復のためにそれぞれ 3 箇所以上の顕微鏡視野について計数を行い、発芽率の平均値を算出した。

#### 2-2-2-3 収量の調査

*spff* 変異体と 'Micro-Tom' 野生株を INRA の温室にて播種し、脇芽とりや花房数の制限を一切行わずに栽培した。野生株と *spff* 変異体でそれぞれ果実が概ね赤熟したタイミングで全果実を収穫し、一株あたりの果実数と果実重を測定した。

### 2-2-3 単為結果原因遺伝子の同定

#### 2-2-3-1 品種間多型を用いた連鎖解析による SPFF 遺伝子座の絞り込み

先行研究では *spff* 変異体 (遺伝的背景は 'Micro-Tom') と野生株 (遺伝的背景は 'Ailsa-Craig') の交雑 F<sub>2</sub> 集団が作出されていた。そのうち 143 個体が野生型, 43 個体が



*spff* 変異型の表現型を示していた。これらのゲノムを用いて、*SPFF* 遺伝子の座乗領域のさらなる絞り込みを行うため、‘Micro-Tom’ と ‘Ailsa-Craig’ 間に存在する多型情報を Kazusa Marker DataBase から取得し、SNP マーカーによる連鎖解析を行った。先行研究で絞り込まれていたゲノム領域内である第 4 染色体の 59,966,064 bp の位置に座上する塩基多型 TomInf4732 SNP (‘Micro-Tom’ (AAGCTT), ‘Ailsa-Craig’ (AAGATT)) に着目し、連鎖解析を行った。

#### 2-2-3-1-1 PCR 条件

TomInf4732 SNP を検出するために、多型とその近傍の配列を増幅するプライマーセット F4-R4 (表 2-2) を設計した。氷上でマスターミックス ((滅菌水 15.35  $\mu$ L, 10X *Ex Taq* Buffer (タカラバイオ株式会社) 2 $\mu$ L, dNTP Mixture (2.5mM) 1.6  $\mu$ L, F-Primer (10 pmol/ $\mu$ L) (F4) 0.5  $\mu$ L, R-Primer (10 pmol/ $\mu$ L) (R4) 0.5  $\mu$ L, *TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ株式会社) 0.05  $\mu$ L)  $\times$  サンプル数) を作成し、DNase フリーの 0.2 mL 8 連チューブに 20  $\mu$ L ずつ分注した。各チューブに鋳型となるサンプル DNA を 0.5  $\mu$ L 添加するとともに、ネガティブコントロールのチューブにはマスターミックス作成に用いた蒸留水を 0.5  $\mu$ L 入れ、蓋をして卓上遠心器でスピンドウンした。サーマルサイクラーを用いて 3 ステップ PCR (初期熱変性 94 $^{\circ}$ C 2 分, 熱変性 94 $^{\circ}$ C 30 秒, アニーリング 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 伸長反応 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 最終伸長反応 72 $^{\circ}$ C 5 分, 35 サイクル) を行った。

#### 2-2-3-1-2 制限酵素処理

PCR 増幅産物 20  $\mu$ L に対して Buffer M (タカラバイオ株式会社) を 2  $\mu$ L, AAGCTT を認識して切断する制限酵素 *Hind* III (タカラバイオ株式会社) を 0.5  $\mu$ L を加え、37 $^{\circ}$ C の高温器で 8 時間以上静置した。

#### 2-2-3-1-3 電気泳動

3% アガロースゲルを用いて、100 V, 20 分の電気泳動を行い、各遺伝子型を識別した。アガロースゲルの作成は、ビーカーに 1xTAE バッファー 100 mL とアガロース 3 g を入れ、口にラップを軽くかけて電子レンジで加熱した。沸騰したら取り出してよく攪拌した。光にかざしてアガロースの粒が見えなくなるまで加熱と攪拌を繰り返してアガロース粒子を水和させた後、ビーカーごと冷水につけて冷却し、60 $^{\circ}$ C 程度まで液温が下が

ったことを確認して SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) 1  $\mu$ L を添加した。ゲルメーカーに流し込み、コームを差し込み、30 分から 40 分放置してゲルを完全に固めた。このとき、ゲルの厚さが薄い方が結果のバンドがはっきりと見えるため、ゲルの厚みは 5 mm 程度になるように留意した。コームを外したゲルを、1xTAE で満たした泳動バッファに沈め、ローディングバッファと混合した DNA 溶液をウェルの上限までアプライし、泳動を開始した。泳動終了後は、ゲルを水道水で軽く洗い、蒸留水で表面を流した後に、UV トランスイルミネーターを用いて DNA を可視化した。

### 2-2-3-2 NGS 解析で同定された原因遺伝子候補の連鎖解析

先行研究では GATK version 3.5 (McKenna et al., 2010) を用いた解析により、*spff* 変異体の *SPFF* 遺伝子座候補領域内に SNP と Indels が検出された。うちリード数が 10 以上かつ SNP/Indel index=100 の SNP と Indels が、*spff* 候補変異とされていた。46 遺伝子内に合計 77 個みつかった *spff* 候補変異のうち、*Solyc04g076020*, *Solyc04g076100*, *Solyc04g076250*, *Solyc04g076320*, *Solyc04g077010* に引き起こされた計 5 つの SNP/Indels に着目し、連鎖解析を行った。

また、*spff* 変異体にランダムに引き起こされた変異バックグラウンドを減らした個体を作成する目的で、*spff* 変異体を Micro-Tom で 4 回戻し交配した BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 分離集団を作成した。連鎖解析には、F<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> の分離集団からなる合計 163 個体 (*spff* 変異型 83 個体、野生型 80 個体) のゲノム DNA を用いた (表 2-1, 図 2-1)。

#### 2-2-3-2-1 BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 個体からの DNA の抽出

簡易ゲノム抽出法、あるいは自動核酸抽出器 Maxwell 16 を用いて各個体から全ゲノムを抽出した。簡易ゲノム抽出法では、小指の爪の大きさを目安とした植物の若葉を 1 枚、1.5 mL チューブに採取し、氷上でペッスルを用いてすり潰した。このとき、葉が多すぎたり、成熟した葉を用いたりした場合には、抽出ゲノム中の不純物が増えてしまうため、なるべく若い葉を少量サンプリングすることを留意した。Edwards Solution (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM 塩化ナトリウム, 25 mM EDTA, and 0.5% SDS) を 300  $\mu$ L 添加した後、13,000 rpm で 5 分遠心分離した。遠心分離により沈降したペレットを傷つけないように気をつけながら、上清 300  $\mu$ L を新しい 1.5 mL チューブに分注した。上清 300  $\mu$ L に対してイソプロパノール 250  $\mu$ L を添加し、軽くピペッテオングした後、蓋を閉め

て転倒混和した。氷上で 20 分間静置した後、13,000 rpm で 20 分間遠心分離し、チューブ底面のペレットを傷つけないように注意しながら上清をピペットで完全に取り除いた。300  $\mu$ L の 70%エタノールを加えてペレットが見えなくなるまでボルテックスミキサーで攪拌し、13,000 rpm で 5 分遠心分離した。上清のエタノールを除去し、真空遠心濃縮器による遠心またはドラフト内での静置により、チューブ内のエタノールと水分を完全に揮発させた。チューブの壁面を流すように注いだ 40  $\mu$ L の Nuclease-Free water でゲノム DNA を溶出した。

Maxwell 16 を用いた抽出法では、4~5 枚の植物の若葉を 1.5 mL チューブに採取し、蓋を閉めチューブごと液体窒素に入れて凍結させた。凍結した若葉をペッスルで粉末状になるまですり潰し、Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit (Promega)のプロトコルに従って 400  $\mu$ L の Elution Buffer でゲノムを抽出した。

#### 2-2-3-2-2 PCR および配列の解読

*spff* 候補変異の有無を検出するために、変異とその近傍およそ 300 bp の配列を増幅するプライマーセットを 5 つの候補変異に対してそれぞれ設計した(表 2-2)。PCR には *TaKaRa Ex Taq* (TAKARA) を使い、2-2-3-1-1 に上述した方法で *spff* 候補変異を含む領域を増幅した。PCR 後、プライマー等の一本鎖 DNA を消化するため、増幅産物 5  $\mu$ L と *Illustra ExoStar 1-Step* (GE Healthcare) 2  $\mu$ L を新しい DNase フリーの 0.2 mL 8 連チューブにて混和し、37°C で 45 分間インキュベートした後、80°C で 15 分間の熱処理をした。増幅産物と *ExoStar* の混和液 3  $\mu$ L に、精製水 16.5  $\mu$ L、Forward primer (10 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L を添加したサンプルを Eurofins Genomics に送付し、DNA シーケンスに配列解読を委託した。

#### 2-2-3-3 SPFF 遺伝子コンストラクト構築と遺伝子導入

RNA 干渉 (RNAi) により *SPFF* 遺伝子のノックダウンを行うため、Gateway クローニングテクノロジー (Invitrogen) を使用して RNAi コンストラクトを構築した。RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて 'Micro-Tom' 野生株の開花日の子房から Total RNA を抽出し、RNA Clean&Concentrator (ZYMO RESEARCH) でゲノム DNA を除去した。次に、SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) を使用して cDNA を合成した。KOD Plus キット (TOYOBO) および SIXIPRNAiF1 と SIXIPRNAiR1 のプライマ

一 (表 2-2) を用いて, 合成した cDNA を鋳型とした PCR を行い, *Solyc04g077010* 転写産物の 521 bp の断片を得た. 得られた断片を, pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen) でクローニングした. 遺伝子導入用のベクター pBI-sense, antisense-GW vector (INPLANTA INNOVATIONS INC) に Gateway LR クロナーゼ II 酵素ミックス (Invitrogen) を用いてクローニングし, 35S プロモータにより高発現するコンストラクトを作製した. pBI-sense, antisense-GW vector (Inplanta innovations) を持つアグロバクテリウムはカナマイシン培地での選抜とコロニー PCR による NPT III チェックにより選抜した. ‘Micro-Tom’ への形質転換は所属研究室のプロトコルに従い, 形質転換体はカナマイシンで選抜した (Sun et al. 2006).

#### 2-2-4 同定遺伝子による単為結果メカニズムの解明

##### 2-2-4-1 RNA シーケンス解析

‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体を比較するため, 網羅的に全転写産物の量を解析する RNA シーケンスを行った. 野生株および *spff* 変異体より, 開花日かつ未受粉の雌蕊から柱頭を取り除いた子房を採取し, 速やかに液体窒素で凍結させた. 生物学的反復のために, 約 50 個の子房を採集し, 15~17 個ごとに 1.5 mL チューブに分け入れ, 3 反復分のサンプルとした. 採集した子房はビーズショッカーを用いて細かく粉砕した. RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて子房から Total RNA を抽出し, RNA Clean & Concentrator (ZYMO RESEARCH) でゲノム DNA を除去した後, SuperScript VILO cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた reverse transcription PCR (RT-PCR) により cDNA を合成した. RNA シーケンスは外注により行い, HiSeq (illumina) により 100 bp シングルエンドリードでシーケンスされた. 取得されたデータによる発現量解析は, 矢野亮一博士により (Yano et al., 2018) の手法に準じて行われた. 3 反復の Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads (RPKM) の平均値が 1 以上の遺伝子が発現していると見なされ,  $\log_2$  変換した RPKM 値が野生株と *spff* 変異体を比較して  $\geq 1.0$  または  $\leq -1.0$  の遺伝子が, 発現に差のある遺伝子として抽出された.

##### 2-2-4-2 RNAi 形質転換体のリアルタイム PCR による発現分析

RNAi 形質転換体で標的遺伝子の発現が抑制されていることを確かめるため, リアルタイム PCR により *SPFF* 遺伝子の転写産物の定量を行った. ‘Micro-Tom’ 野生株と形質

転換体の葉を液体窒素中で粉碎し、「2-2-4-1 RNA シーケンス解析」に記したサンプル調整と同様の手法で Total RNA の抽出および DNA 除去と逆転写反応を行った。cDNA を滅菌水で 10 倍に希釈した後、氷上に置いた専用反応プレート内で cDNA 1  $\mu$ L に対して、SYBR Premix *Ex* Taq (タカラバイオ株式会社) 6.3  $\mu$ L, 滅菌蒸留水 4.75  $\mu$ L, Forward primer (F32) (10 pmol/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, Reverse primer (R32) (10 pmol/ $\mu$ L) 0.25  $\mu$ L, を添加し, CFX96 system (Bio-Rad) を使用してリアルタイム PCR を行った (表 2-2)。リアルタイム PCR は、初期熱変性 95°C 30 秒, 熱変性 95°C 5 秒, アニーリングおよび伸長反応 60°C 30 秒 (40 サイクル), の温度条件で行った。反応効率を評価するため、'Micro-Tom' 野生株の cDNA を 20 ng/ $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L, 5 ng/ $\mu$ L, 2.5 ng/ $\mu$ L, 1.25 ng/ $\mu$ L, 0.625 ng/ $\mu$ L に滅菌蒸留水で段階的に希釈した希釈系列を用いてリアルタイム PCR を同時に行い、サイクル値 (Threshold Cycle, Ct) を y 軸, DNA ターゲットの初期量を x 軸として作成した検量線の相関係数が 0.98 以上であることを確認した。また、用いたプライマーの特異性を確認するため、融解曲線と融解温度 ( $T_m$ ) 値を確認した。一般にリアルタイム PCR では反応系内の cDNA 量や転写効率の差を補正するため、一定の発現量を持つ遺伝子 (内在性コントロール遺伝子) を基準としてターゲット遺伝子の発現量を定量するが、本実験においては内在性コントロール遺伝子には *SAND* を用い (表 2-2) (Exposito-Rodriguez et al., (2008)), デルタ-デルタ CT 法 (Pfaffl, 2001) で計算した。

### 2-2-4-3 *in situ* ハイブリダイゼーションによる発現解析

#### 2-2-4-3-1 サンプルングおよびサンプル固定

開花前の蕾を「2-2-2-1 子房細胞の切片観察」に上述した「2-2-2-1-1 サンプルングおよび脱気」の要領でサンプルング並びにサンプル固定を行ったが、本実験においては FAA 溶液の代わりに、次に記す方法で作成した RNase フリーのパラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde, PFA) 溶液を用いた。まず、PFA 10 g と NaCl 2.25 g を Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理した超純水に溶解し、60°C で 1 時間加温した。パラホルムアルデヒドが完全に溶解するまで 5 M 水酸化ナトリウム水溶液を添加し (約 50  $\mu$ L) 激しく振盪させた。次に、溶液が入ったボトルを氷上に移し、DEPC 処理した超純水で 112 mL にメスアップした後、酢酸 12.5 mL と 100%エタノール 125 mL を添加した。PFA の保管は氷上で行い、調整から 6 時間以内の新鮮な溶液をサンプル固定に用いた。固定した蕾は実体顕微鏡下で長さを測定し、24 時間ごとに 70%エタノール、95%エタノール

(2回), 100%エタノール (4回), Histo-Clear (National Diagnostics) (3回), パラフィン (2回) へと溶液を交換し, 脱水およびパラフィン置換を行った.

#### 2-2-4-3-2 RNA プローブ作成

##### 2-2-4-3-2-1 テンプレート作成

*SPFF* 遺伝子の転写産物を検出する RNA プローブの合成は, 下記のように行った. 播種後3週間の 'Micro-Tom' 野生株 10 個体の根を, 余分な土を取り去るために白くなるまで水道水でよく洗った. キッチンペーパーで水分を拭き取り, 計 0.1 g の根を 1.5 mL チューブに入れ, 液体窒素で凍結後, すり潰した. TRIzol (Thermo Fisher Scientific) を 1 mL 加え, 室温で 5 分間インキュベートした後, クロロホルム 200  $\mu$ L を添加, 転倒混和し, 3 分間室温に静置した. 9°C に冷却した遠心分離機で 15,000 rpm 10 分の遠心分離を行い, 上清 500  $\mu$ L を新しい 1.5 mL チューブに採取した. イソプロパノール 500  $\mu$ L を加えて室温で 10 分間インキュベートした後, 4°C に冷却した遠心分離機で 15,000 rpm 10 分の遠心分離を行った. 上清をデカントで捨て, 70%エタノール 1 mL を添加しボルテクスミキサーでペレットをよくリンスした後, 再び 4°C に冷却した遠心分離機で 15,000 rpm 5 分間の遠心分離を行った. 上清を除去し, 清潔な紙の上にチューブを逆さまに立て, 10 分間程度静置して水分とエタノールを揮発させた. DEPC 処理した超純水を 35  $\mu$ L 添加し, RNA を溶出した. その後, 「2-2-4-1 RNA シーケンス解析」の項に記載した方法で DNA を除去, cDNA を合成した. 合成した cDNA 鋳型として, GoTaq (Promega) および ishF2 と ishR1 のプライマーセット (表 2-2) を用いて PCR を行い, アガロースゲルからの DNA 抽出によって 775 bp の増幅産物を得た. 次に, 1  $\mu$ L の増幅産物を鋳型として, ishT7F2 と ishR1 のプライマーセット, および ishF2 と ishT7R1 のプライマーセット (表 2-2) を用いて GoTaq による PCR を行い, それぞれ 3'末端 (アンチセンスプローブ用) と 5'末端 (センスプローブ用) に T7 配列を追加した. 末端に T7 配列が付与された増幅産物を, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) でゲル抽出し, 精製した. 委託実施したシーケンスにより増幅サンプルの配列を確認した.

##### 2-2-4-3-2-2 RNA プローブの合成

DIG RNA Labeling Kit (Sp6 / T7) (Roche) を使用してプローブを合成した. キットのプロトコルに従いテンプレートに T7 ポリメラーゼを添加した後は穏やかに混合し, 37°C

の恒温器で一晩インキュベートした。翌朝、DNase 処理を 37°C で 15 分行った後、氷上でプローブに、0.5 M EDTA 0.5  $\mu$ L, DEPC 処理した超純水 15.5  $\mu$ L, 4M LiCl 3  $\mu$ L を添加し、-80°C に冷却した 3 倍量のエタノール (90  $\mu$ L) を加えた。1.5 mL チューブに移し替え、4°C に冷却した遠心分離機で 16.1 rcf, 30 分間遠心分離し、上清を廃棄した。70% EtOH (使用するまで -20°C で保存, DEPC 処理した超純水で作製) 200  $\mu$ L を添加し、再び 4°C に冷却した遠心分離機で 16.1 rcf, 30 分間遠心分離した。上清を捨て、チューブをクリーンベンチで乾燥させた後、25  $\mu$ L の DEPC 処理した超純水でプローブを溶出した。プローブは -80°C で保存した。

#### 2-2-4-3-3 ドットプロットを用いたプローブ濃度の確認

合成したプローブと、濃度既知のプローブ (Dig RNA Labeling Kit より) を、DEPC 処理した超純水を用いて  $10^{-1}$  倍、 $10^{-2}$  倍、 $10^{-3}$  倍、 $10^{-4}$  倍に希釈した希釈系列をそれぞれ作成した。メンブレン (Transfer membrane 30cm x 3m Rolls 60106 Biotex A, 0.45  $\mu$ m / pkg) に 1  $\mu$ L ずつ、直線上にサンプルを滴下し、希釈系列の各サンプル液が直径 1-3 mm に滲むのを確認した。UV イルミネータを用いてメンブレンに UV 254 nm 光を 3 分間照射した後、直径 10 cm のシャーレにメンブレンを置き、buffer 1 (1M Tris HCl pH = 7.5, 3M NaCl / L) でメンブレンを 5 分間  $\times$  2 回洗浄した。次に buffer 2 (100 mL の buffer1 あたり 1 g の Blocking Reagent (Sigma) を溶かした溶液) に浸して室温で 20~30 分し、さらに一次抗体 6.5  $\mu$ L を 13 mL の buffer 2 で希釈した溶液に浸けて室温で 30 分間インキュベートした。Buffer1 で 5 分間  $\times$  4 回、buffer3 (1M Tris-HCl pH = 9.5, 3 M NaCl, 1M MgCl<sub>2</sub>) で 5 分間  $\times$  1 回洗浄したのち、使用直前に調整した NBT-BCIP 試薬 (Roche) に浸して 37°C の暗所で 30-80 分間インキュベートした。15 分ごとにシグナルを確認し、濃度既知のプローブのシグナル濃度と比較することで、合成したプローブの濃度を推定した。

#### 2-2-4-3-4 *in situ* hybridization

RNA 分解酵素 (RNase) を除去するために、実験前にすべての実験器具 (Kartell POM Slide Staining Trough (スライド染色槽)、メスシリンダー、マグネチックスターラー) を 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。パラフィンに固定されたサンプルはロータリーマイクロトームを用いて 8 mm 厚の切片にスライスし、「2-2-2-1-3 切片の作成」の項に上述した手法でスライドガラスに展着した。このとき、スライドガラスは正電荷にチ

ヤージされたスーパーフロストプラス スライドガラス (Fisher Scientific)を用い, 切片を伸展させる際には Tween 20 を 0.5%溶かした DEPC 処理済み超純水を用いた. また, 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体のシグナル強度を同じ条件下で直接比較するため, 野生株と *spff* 変異体の両方の切片を同じスライドガラスに乗せた. スライドガラスをスライド染色槽にセットし, Histo-Clear (NDF) (10 分×3 回), 100%エタノール (10 分×2 回), エタノールシリーズ (96%, 85%, 70%, 50%, 30%) (各 1 分), 1x PBS (5 分×2 回), 0.3% TritonX-100 (15 分), プロテイナーゼ K (Sigma) (37°Cで 30 分), 100 mM グリシン-PBS 溶液 (5 分), 1x PBS (5 分), ホルムアルデヒド 4%溶液 (氷上で 5 分), 1x PBS (5 分×2 回), トリエタノールアミン (PROLABO) 0.1M + 酢酸 0.25% 混合液 (pH = 8.0) (10 分), 1x PBS (5 分×2 回), エタノールシリーズ (30%, 50%, 70%, 85%, 95%) (各 1 分), 100%エタノール (1 分×2 回), に順に浸したのち, スライドガラスを清潔な紙の上で風乾した (約 10 分).

プレハイブリダイゼーションとして, 2X SSPE に 50%(V/V)ホルムアミド 500 µg, tRNA (10 µg/µL) (Roche), 500µg salmon sperm DNA (10 µg/µL) (Roche), 1x Denhard's solution, と 10% (P/V) Dextran Sulfate (Sigma) を溶かした溶液 (プレハイブリダイゼーションミックス) を, スライドあたり 200 µL 滴下しカバーガラスで封入して冷暗所で 30 分以上静置した. プレハイブリダイゼーション後, プレハイブリダイゼーションミックス 500 µL に RNA プロブ 4 µL を添加し, 80°Cで 5 分インキュベートしてハイブリダイゼーションミックスを作成した. 切片を傷つけないように気をつけながらカバーガラスを 2X SSPE 内で取り外し, スライドガラスあたり 90 µL のハイブリダイゼーションミックスをカバーガラスで封入して, 47°Cの暗所で一晚 (13~16 時間) 静置した. 翌朝, 切片を傷つけないように気をつけながらカバーガラスを 2X SSPE 内で取り外し, 染色槽にセットしたのち, スライドガラスを 2X SSPE 溶液 (15 分×4 回), 1X SSPE 溶液 (30 分), 0.2X SSPE 溶液 (65°C, 30 分), 0.5X SSPE (30 分) の順で洗浄した. 次いで, 1X NTE 溶液 (5 分), 1X NTE + 20 µg/mL RNase A 溶液 (37°C, 20 分), buffer1 (5 分×2 回), BSA 洗浄液(30 分), で処理した. スライドガラスを染色槽から外し, BSA 洗浄液で 500 倍希釈した anti-digoxigenin Fab fragments (Roche) をサンプルに 150 µL 滴下してカバーガラスで封入した. 4°Cの暗所で一晚 (13~16 時間) 静置したのち, カバーガラスを外して buffer1 (10 分×4 回), buffer3 (5 分×2 回)で洗浄し, 使用直前に調整した NPT-BCIP 染色液 (Roche) を



150  $\mu$ L 滴下してカバーガラスで封入した。紫あるいは茶色のシグナルが検出されるまで室温かつ暗所でインキュベートし、24 時間ごとに NPT-BCIP 染色液を交換した。

#### 2-2-4-4 サフラニン-アストラブルー二重染色

維管束の師管と導管の配置パターンの観察のため、サフラニン・アストラブルーの二重染色による師部と木部の染め分けを行った。組織切片は 2-2-2-1-1 から 2-2-2-1-3 までの要領で作成し、‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体のシグナル強度を同じ条件下で直接比較するため、野生株と *spff* 変異体の両方の切片を同じスライドガラスに乗せた。スライドガラスをスライド染色槽にセットし、Histo-Clear (10 分)、100% EtOH (10 分) の順に浸漬させ、脱パラフィンを行った。スライドガラスを十分に乾燥させた後、2%アストラブルー溶液に 30 秒間、蒸留水に 10 秒間、0.5%サフラニン溶液に 10 秒間、再び蒸留水に 10 秒間、2%アストラブルー溶液に 7 秒間、0.5%サフラニン溶液に 10 秒間、2%アストラブルー溶液に 10 秒間、の順に浸漬を行い、師部と木部を染め分けた。蒸留水への浸漬時にはスライド上の余剰なアストラブルー溶液を洗浄する目的で、蒸留水中で静かにスライドガラスを上下させた。最後に超純水を用いて組織を軽く洗浄し、カバーガラスで封入し検鏡した。

### 2-3 結果および考察

#### 2-3-1 *spff* 変異体の特徴付け

*spff* 変異体を ‘Micro-Tom’ 野生株の花粉と 4 回戻し交配し自殖した BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 植物のうち、*spff* 表現型を示した個体を観察した (表 2-1, 図 2-1)。結果を 2-3-1-1 から 2-3-1-5 に記す。

##### 2-3-1-1 果実の測定

*spff* 変異体の果実を定量的に特徴付けるために、*spff* 変異体の単為結果率、果実径、果実重を測定した。その結果、単為結果率 (着果した果実のうち、単為結果果実が閉める割合) は 100%を示した。また、果実径が小さくなることや、果実重の減少についても、‘Micro-Tom’ 野生株と比較して定量的に有意な減少が認められることを確認した (図 2-2)。

### 2-3-1-2 子房切片の観察

雌蕊の細胞を観察するため、開花当日の子房の横断面切片を作成し、子房壁における細胞の層数と大きさを測定した結果、*spff* 変異体の子房では、'Micro-Tom' 野生株と比べて子房壁の細胞層が少ないことがわかった。一方、*spff* 変異体の子房壁の細胞の大きさは野生株と比較しておよそ 1.3 倍大きいこと (野生株 =  $202 \pm 17 \mu\text{m}^2$ , *spff* 変異体 =  $272 \pm 11 \mu\text{m}^2$ ) がわかった (図 2-3)。これは、*spff* の単為結果が細胞分裂の活性化ではなく、細胞肥大に関連して引き起こされていることを示唆した。

### 2-3-1-3 生殖器官の観察

*spff* 変異体では、花弁、萼、雌蕊、雄蕊が 'Micro-Tom' 野生株と比較して小さかった (図 2-4 A-C, E-G)。また、葯に含まれる花粉数は野生株に比べて有意に少なかった (図 2-4 K)。花粉発芽培地における花粉の発芽実験では、野生株では観察された総花粉数の  $60 \pm 5\%$  が花粉発芽を示したのに対して、*spff* 変異体では花粉の発芽率が 0%であった (図 2-4 I, J, L)。このことから、*spff* 変異体の雄性不稔性が示された。

開花当日の葯を観察すると、野生株に比べて花粉嚢が細く、それぞれの花粉嚢の間に隙間が空いていることがわかった (図 2-4 C, G)。また、開花当日の葯の切片を観察すると、*spff* 変異体では葯が野生株よりも小さいことに加え、花粉嚢がつぶれた異常な形状が観察された (図 2-4 D, H)。このことから、葯が正常に発達しないことにより雄性不稔がもたらされている可能性が考えられた。

### 2-3-1-4 収量の調査

*spff* 変異体の生育速度が野生株よりも遅く、'Micro-Tom' 野生株の果実が赤熟する播種 2 ヶ月後に *spff* 変異体は全く果実をつけていなかった (図 2-5 A, B)。野生株と *spff* 変異体でそれぞれ果実が赤熟する、野生株の播種後 112 日目と、*spff* 変異体の 173 日目において、全果実を収穫し、一株あたりの果実数と収量を測定した。その結果、*spff* 変異体では野生株と比較して 1 株あたりの果実数が 2 倍程度多かったのに対し、1 株当たりの収量 (赤い果実の合計重) は野生株の 28%に少なかった (図 C, D, E, F)。この収量の低さは果実形の小ささと、それに起因する 1 果実あたりの果実重の軽さが原因だと考えられた。

### 2-3-1-5 草姿および栄養器官の観察

*spff* 変異体は, 'Micro-Tom' 野生株と比べて, 脇芽と花芽の発達が活発であった. 野生株では一つの脇芽が一つの花芽を持つのに対し, *spff* 変異体では脇芽がさらなる脇芽と花芽を伸ばすことにより, 脇芽と花芽の数が増える特徴があった. この活発な脇芽と花芽の発達は草姿全体に影響を及ぼし, 全体として葉や茎の密度の高い表現型を示した (図 2-6). これらの特徴は, *spff* の原因変異が植物の生殖だけでなく栄養成長にも影響を与える可能性を示唆した. 一方, *spff* 変異体では成熟葉の色や鋸歯を含む形態に発達異常は見られなかった. また, *spff* 変異体でのアントシアニンの過剰蓄積 (2-3-3-3-2 相同遺伝子の機能欠損体と *spff* 変異体の表現型比較に着目の理由を後述) も見られなかった.

### 2-3-2 SPFF 遺伝子の同定

#### 2-3-2-1 連鎖解析による SPFF 候補遺伝子の絞り込み

まず, 品種間多型を利用した連鎖解析を行った. *spff* 変異体と 'Ailsa-Craig' の交雑 F<sub>2</sub> 集団のうち, 野生型の表現型を示す 33 個体と *spff* 変異体型を示す 43 個体の合計 73 個体について, 各個体の tomInf4732 SNP の遺伝子型を判別した. その結果, 野生型を示す F<sub>2</sub> 個体のうち 3 個体が Micro-Tom の遺伝子型を, *spff* 変異体型を示す F<sub>2</sub> 個体のうち 2 個体が 'Ailsa-Craig' の遺伝子型を持っていた. このことから, TomInf4732 SNP の遺伝子型が *spff* 変異体の表現型と完全に連鎖していないことが示された.

次に, GATK で変異が検出された遺伝子のうち, Tomato eFP Browser により花や果実で比較的高い発現を示した遺伝子およびコードするタンパク質に与える影響が大きい変異を含む遺伝子 (*Solyc04g076020*, *Solyc04g076100*, *Solyc04g076250*, *Solyc04g076320*, *Solyc04g077010*) に引き起こされた計 5 つの SNP/Indels に着目し, 連鎖解析を行った. *Solyc04g076020*, *Solyc04g076100*, *Solyc04g076250*, *Solyc04g076320*, に引き起こされた変異は, 表現型と遺伝子型の完全な連鎖が確認されなかったのに対し, *Solyc04g077010* に引き起こされた 2 bp の欠失変異は, 用いた F<sub>2</sub> 集団で野生型の表現型を示す 83 個体と *spff* 変異体型を示す 80 個体の合計 163 個体について, 表現型と遺伝子型の完全な連鎖が確認された (表 2-3).

### 2-3-2-2 候補遺伝子 *Solyc04g077010* の選出

連鎖解析で完全な連鎖の確認された *Solyc04g077010* のポジション 59,564,428 に引き起こされた 2 bp の欠失変異 (ATC→A) は, *Solyc04g077010* の 1 番目のエクソンに位置し, フレームシフトを引き起こすことが分かった (ITAG2.4). *Solyc04g077010* は 957 個のアミノ酸からなる受容体様タンパク質をコードしており, このフレームシフトは 494 番目のアミノ酸の位置に終止コドンをもたらす. この受容体様タンパク質は, ロイシンリッチリピートを含む受容体ドメイン, 膜貫通ドメイン, キナーゼドメインからなることが予測され, 変異によりもたらされた終止コドンは受容体ドメインに位置する. このことから, 膜貫通ドメインとキナーゼドメインのない, 機能欠損した受容体様タンパク質が生成される. この受容体様タンパク質の機能欠損が *spff* 変異体の表現型をもたらすことが示唆された. 以上より, *Solyc04g077010* を *SPFF* 遺伝子の候補遺伝子, ポジション 59564428 に存在する 2 bp の欠失変異を *spff* 変異の候補変異とした (図 2-7).

### 2-3-2-3 RNA サイレンシング (RNAi) による *SPFF* 遺伝子の同定

候補遺伝子が真に *SPFF* 遺伝子であることを確認するために, RNAi を使用して *Solyc04g077010* の発現を抑制した. RNAi ベクターの作成にあたり, *Solyc04g077010* の mRNA 配列から, トマトの他の遺伝子で保存されている可能性の低い領域を Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 検索により探索した. その結果, 第一エクソンのうち受容体ドメインをコードしている 521 bp の領域がトマトの他の遺伝子で保存されている可能性が低いことが分かり, この 521 bp を RNAi の標的配列とした. 作出したベクターを用いて形質転換を行った結果, 標的タンパク質の mRNA の発現の著しい減少を示す 3 個体の形質転換体 (それぞれ異なるカルスから再分化が誘導された 3 系統の形質転換体) を得た. この 3 系統の形質転換体の表現型を目視により確認すると, 花器官が小さい, 果実径が小さい, といった *spff* 変異体の表現型を示していた. また, 果実内に種子が含まれていなかったことから, 単為結果であることが示された (図 2-8). 以上より, *spff* 変異体の表現型は, *Solyc04g077010* がコードする受容体様タンパク質の機能欠損により引き起こされていることが示された. 以上より, *Solyc04g077010* を *SPFF* 遺伝子であると同定した.

### 2-3-3 *spff* 変異による単為結果メカニズムの解明

#### 2-3-3-1 *SPFF* 遺伝子の発現パターンの特徴付け

##### 2-3-3-1-1 既存のデータベースによる特徴付け

*SPFF* 遺伝子がどの器官あるいは組織で発現しているのかを明らかにするため、トマトの遺伝子の網羅的な発現解析を行った先行研究に着目した (図 2-9). 発現解析プロファイリング (tomato eFP browser (Winter et al., 2007, The Tomato Genome Consortium, 2012)) から, *SPFF* 遺伝子は根, 葉, 花, を含む様々な器官で発現していることが分かった. また, 器官別のトランスクリプトーム解析を行った先行研究から, *SPFF* 遺伝子の根, 茎, 葉, 発達中の雌蕊で発現が確認された (Ezura et al., 2017). また, 果実で組織別のトランスクリプトーム解析を行った先行研究により, 発達中の果皮の維管束組織, 果実の柱軸で, 周辺組織よりも強く発現していることが明らかにされた (Shinozaki et al., 2018).

##### 2-3-3-1-2 *in situ* hybridization 法による空間的な発現解析

発達中の蕾を対象として, *SPFF* 遺伝子がどの組織で発現しているのかを明らかにするため, *in situ* hybridization 法を行った. *in situ* hybridization 法は, 組織ごとの遺伝子発現の強弱を確認することができる. (シグナルとして染色されるための遺伝子発現量の閾値が高いため, 発現シグナルが確認できなかった器官でも弱く遺伝子発現がある可能性は残されている). ‘Micro-Tom’ 野生株の発達段階の異なる蕾を複数用い, 遺伝子発現を示すシグナルの組織別の強度を確認した. 長さが 1.1 mm, 2.9 mm, 4.5 mm の蕾においては, 花托の維管束細胞で発現シグナルが確認された. 長さが 4.5 mm の蕾では, 柱軸の維管束細胞でも発現シグナルが観察された (図 2-10).

##### 2-3-3-2 *spff* 変異がもたらす転写レベルの影響解明

###### 2-3-3-2-1 *in situ* hybridization 法およびリアルタイム PCR による *SPFF* 遺伝子の転写レベルの解明

ひとつのスライド上で同条件にてハイブリダイゼーションを行うことにより, ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の蕾における *SPFF* 遺伝子の発現量を比較した. 長さ 4 mm の蕾の花托の維管束組織での発現シグナル強度を比較した結果, *spff* 変異体では *SPFF* 遺伝子の発現シグナルが野生株と比較して弱く, *spff* 変異が当該遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが示唆された (図 2-11 A, B). ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体における

*SPFF* 遺伝子の発現量を定量するため、リアルタイム PCR を行った。サンプルには、先行研究の器官別の発現量プロファイルにより比較的高い発現量が示されていた、葉を用いた。その結果、*spff* 変異体では *SPFF* 遺伝子の発現量が野生株と比較しておよそ 60% と低く、*spff* 変異が当該遺伝子の発現量に影響を及ぼすことが示された (図 2-11 C)。

### 2-3-3-2-2 RNA シーケンスによる子房の転写産物の網羅的解析

発達前の果実である開花当日の子房において、*spff* 変異が他の遺伝子の転写に与える影響を解明するため、'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の子房を用いた RNA シーケンス解析を行った。その結果、25 個の発現量の増減した遺伝子を同定した。うち *spff* 変異体の子房で野生株よりも発現量が高かった遺伝子 ( $\log_2$  fold-change > 1) は 13 個、低かった遺伝子 ( $\log_2$  fold-change < -1) は 12 個であった (表 2-4)。

*spff* 変異体で発現量が高かった遺伝子のなかでも、*SIGA20ox1* (*Solyc03g006880*) の発現レベルは、野生株で観察された発現レベルの 10 倍以上の発現量が確認された。*SIGA20ox1* は受粉によって発現が誘導されるジベレリン合成関連の遺伝子で、単為結果との関連も報告されている遺伝子である。先行研究のトランスクリプトーム解析により、*SIGA20ox1* は受粉前にジベレリンを処理した雌蕊において、処理しなかった雌蕊よりも高い発現量を示すことが明らかにされていた。

*spff* 変異体で発現量が低かった遺伝子には、*Solyc02g078150*, *Solyc12g094620*, *Solyc05g005150* が含まれた。これらの遺伝子はそれぞれ、Plant-specific domain TIGR01615 family protein, catalase, F-box/Kelch repeat-containing F-box family protein にアノテーションされている。これら 3 つの遺伝子についても、受粉前にジベレリンを処理した雌蕊において、無処理の雌蕊と比べて低い発現量を示すことが先行研究により明らかにされていた。

以上より、*spff* 変異体の単為結果には、受粉前の雌蕊でのジベレリン合成が関与している可能性が示唆された。

### 2-3-3-3 相同遺伝子の探索および相同遺伝子の変異体との表現型比較

#### 2-3-3-3-1 BLAST を用いた相同遺伝子の探索

他の植物で類似した機能を持つ遺伝子があるかどうかを調べるため、相同性を持つアミノ酸配列をデータベースから検索する BLASTP プログラムを用いた相同遺伝子の

検索を行った。その結果、野生型の *SPFF* 遺伝子のアミノ酸は、シロイヌナズナの XYLEM INTERMIXTED WITH PHLOEM1 (*XIP1*) と 63% のアミノ酸の相同性を示した。

#### 2-3-3-2 相同遺伝子の機能欠損体と *spff* 変異体の表現型比較

Bryan らによりシロイヌナズナの *XIP1* の機能欠損変異体 (*xip1*) は、葉の過剰なアントシアニン蓄積、植物体の発育不良をもたらすことが報告されていたが、花粉稔性への影響は報告されていなかった。また、*xip1* では維管束の篩部細胞においてリグニン化した木部細胞の異常な蓄積 (篩部細胞と木部細胞の混在) が報告されていた。

一方、*spff* 変異体では、葉の過剰なアントシアニン蓄積や、*xip1* に見られる植物体の発育不良は見られなかった (図 2-6)。 *SPFF* 遺伝子が維管束組織で周辺組織よりも高く発現していることから、*spff* 変異体の維管束組織の木部を赤に染色するサフラニーンファストグリーン二重染色を行った。サフラニーンは核と細胞壁を赤く染め、特に維管束の縦断面の場合には、リグニンで木化した導管の二次細胞壁が濃色に (暗赤色に) 染色される。一方、アストラブルーは非リグニン化細胞を青く染めるため、維管束では生細胞部分、特に篩管の伴細胞が染色される。 *in situ* hybridization 法で *SPFF* 遺伝子の強い発現を示した花托の横断切片を使用して染色を行い、検鏡した結果、*xip1* に見られた篩部細胞と木部細胞の混在は *spff* 変異体の花托には見られなかった (図 2-12)。

以上より、*SPFF* 遺伝子の機能欠損体が *XIP1* の機能欠損体と異なる表現型を示したことから、*SPFF* 遺伝子は相同性の高い *XIP1* とは異なる機能を持つ可能性が示唆された。

#### 2-3-4 第 2 章の結果のまとめ

トマトの大規模突然変異体集団より単離され単為結果性を有する *spff* 変異体の原因遺伝子変異の同定とその単為結果メカニズムの一端の解明を目的とした。 *spff* 変異体とその後代の表現型の観察により、単為結果果実の形成に加え、果実の縮小、花器官の縮小、花粉減少、雄性不稔、子房壁の細胞層数の減少、子房壁の細胞肥大、脇芽と花序の形成パターン変化、という表現型が特徴付けられた。第二世代シーケンサーを用いたゲノム解析により同定されていた *spff* 変異体に特有の遺伝子変異について、単為結果および花器官の縮小の表現型の有無と遺伝子型の相関を確認する連鎖解析を行った。その結果、フレームシフトを引き起こす 2 bp の欠失 (*spff* 変異) を有し受容体様タンパク質をコードする第 4 染色体上の *Solyc04g077010* を候補遺伝子として同定した。

*Solyc04g077010* を標的遺伝子として RNAi 法による発現抑制を行った形質転換体が、花器官の縮小と小さな単為結果果実の形成という *spff* 変異体と同様の表現型を示したため、*Solyc04g077010* を *SPFF* 遺伝子であると同定し、*SPFF* 遺伝子に生じた変異が *spff* 変異体の表現型の原因であると結論づけた。また、*SPFF* 遺伝子に生じた *spff* 変異は、受容体様タンパク質のレセプターライクカイネースドメインに終止コドンを生じさせ機能欠損を引き起こしている可能性が強く示唆された。加えて、この変異は、*SPFF* 遺伝子の発現を負に制御することが示された。

*SPFF* 遺伝子と最も高い (63%) のアミノ酸の相同性を示すホモログはシロイヌナズナの維管束の分化に関与する *XIP1* であった。*in situ hybridization* 法により *SPFF* 遺伝子は発達中の蕾の維管束において周辺組織よりも強い発現が確認されたが、*xip1* の機能欠損個体で報告されている導管と師管の分化パターンの異常は確認されなかった。また、*xip1* の機能欠損個体は葉のアントシアニンの蓄積が確認されたのに対して *spff* 変異体が同様の表現型を示さなかったこと、および *spff* 変異体で見られる強い雄性不稔が *xip1* の機能欠損個体で報告されていないことから、*SPFF* 遺伝子は *XIP1* のオーソログであると断定することはできなかった。

RNA シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析により、*spff* 変異体の受粉前の子房では、本来受粉後に発現が促進されるジベレリン合成遺伝子である *GA20ox1* の転写レベルが野生株と比較して高いことが示された。*GA20ox1* の高発現は、*spff* 変異体の未受粉花において子房壁の細胞が野生株と比較して肥大しているという、ジベレリン感受性の上昇によって誘発される単為結果性果実の特徴と矛盾せず、*spff* 変異体では未受粉の子房におけるジベレリン合成により単為結果果実の形成が誘発されている可能性が示唆された。

### 2-3-5 第2章の考察

第2章では、まず、受粉の要らないトマト果実生産を可能にする単為結果性を持つ新規変異体の原因遺伝子の同定を行った。第二世代シーケンサーを用いたゲノム解析により同定されていた *spff* 変異体に特有の遺伝子変異について、単為結果ならびに花器官の縮小の表現型の有無と遺伝子型の相関を確認する連鎖解析および RNAi 法による遺伝子発現抑制個体の作出を行い、*Solyc04g077010* 上の 2 bp の欠失変異が単為結果の原因であることを証明した。以上より *Solyc04g077010* を *SPFF* 遺伝子として同定し、当該変



異を *spff* 変異と命名した。SPFF 遺伝子は受容体様タンパク質をコードし、*spff* 変異はフレームシフトにより SPFF タンパク質の機能欠損を引き起こすことが示唆された (図 2-7, 図 2-8)。

SPFF 遺伝子と最も相同性の高い遺伝子はシロイヌナズナの *XIP1* 遺伝子であることが BLAST 検索により明らかになったが、その機能欠損個体と *spff* 変異体の表現型の不一致から、SPFF 遺伝子が *XIP1* 遺伝子のオースログであると断定することはできなかった (図 2-12)。シロイヌナズナの *XIP1* 遺伝子と SPFF 遺伝子の機能的な相違を明らかにするためにはさらなる分析が必要だが、本研究の結果から、トマトで特有の機能を獲得した新しい遺伝子である可能性が高いと考えられた。

第 2 章では、次に、*spff* 変異体における単為結果メカニズムの解明を行った。一般に、トマトの単為結果は受粉後の果実形成メカニズムが受粉前から引き起こされることにより誘導されることが知られている (Li et al., 2014)。トマトの果実形成のメカニズムは未だ完全には明らかにされていないが、受粉後の果実では、オーキシンの蓄積により細胞分裂が活性化し、次いで、ジベレリン代謝が誘発されて細胞肥大が引き起こされることが知られている (Martíet al., 2007, Serrani et al., 2007a, 2008)。特に、ジベレリン代謝の活性化はトマトの果実形成に重要な役割を持つことが知られている (Serrani et al., 2008, Shinozaki et al., 2015)。本研究で実施したトランスクリプトーム解析により、*spff* 変異体の未受粉の子房では、ジベレリンの生合成に関わる *GA20ox1* 遺伝子の発現量が野生株と比べて高いことが示されたことや (表 2-4)、子房壁の細胞肥大が観察されたことから (図 2-3)、*spff* 変異体ではジベレリン応答の活性化に起因して単為結果が引き起こされていることが示唆された (Olimpieri et al., 2007, Serrani et al., 2007b, Martí et al., 2007)。また、オーキシン応答反応の活性化により誘発される単為結果は果皮における細胞分裂の活性化と細胞層数の増加をもたらすが (Wang et al., 2009)、*spff* 変異体では同様の表現型が観察されなかったことから (図 2-3)、未受粉子房におけるオーキシン応答反応の活性化により単為結果が誘発されている可能性は低いと考えられた。

加えて、*spff* 変異体の示す強い雄性不稔もまた、単為結果を誘発する因子のひとつであることも示唆された。この仮説は、*MADS BOX* 遺伝子の変異あるいは機能抑制による雄蕊の初期発達異常が単為結果を誘導する例が複数報告されていることや、雄蕊特異的プロモーターによる *BARNASE* 遺伝子の mRNA 過剰発現が雄蕊の初期発達異常と単為結果を誘導することから支持される (Pnueli et al., 1994, Ampomah-Dwamena et al.,

2002, Mazzucato et al., 2008, Quinet et al., 2014, Okabe et al., 2019, Hao et al., 2017, Rojas-Gracia et al., 2017). また, *spff* 変異体が花粉稔性を持たないことも (図 2-4), ジベレリン応答の活性化に影響している可能性がある (Livne et al., 2015). これらの結果は, *SPFF* 遺伝子によりコードされた受容体様タンパク質が受粉前の生殖器官のジベレリン応答を抑制するように機能していることを示唆し, また, *spff* 変異体では雄性器官の発達異常と雄性不稔を介して *GA20ox1* の過剰な発現を促進したことを示唆した. しかし, 花の構造を決定する各種 MADS BOX 遺伝子群と *SPFF* 遺伝子の関連付け, およびそれらが *GA20ox1* 遺伝子の発現調節に関与するメカニズムには, さらなる実験と解明が必要とされている.

*in situ* hybridization による *SPFF* 遺伝子の転写産物の空間的な可視化は, 単為結果の原因遺伝子が発達中の蕾の花托の維管束で比較的高い発現を示すことを明らかにした (図 2-10). これまでトマトの単為結果や果実形成に関与する遺伝子が維管束で高発現している例は報告されていなかったが, 花托の維管束は雄性/雌性の生殖器官の発達と果実形成の過程において, 養分輸送とシグナル伝達に重要な役割を持つ (Rančić et al., 2010). *SPFF* 遺伝子にコードされる受容体様タンパク質は花器官の正常な発達や受粉後の果実形成に不可欠な因子の輸送に関与している可能性があり, このタンパク質の機能欠損は, 雄性不稔を含む花と果実の発達システムの重大な欠陥を誘発する可能性がある. 事実, *spff* 変異体は野生株と比較して小さな花が形成されることから, 物質輸送が滞った可能性がある (図 3, 図 2-4). 今後, 本研究で実施しなかった *spff* 変異体の維管束細胞や物質輸送の変化に関する詳細な解明により, トマトの果実形成や単為結果のメカニズムに新たな知見がもたらされる可能性がある. また, 果実発達における受容体様タンパク質の役割についても未解明の部分が多いが, キナーゼドメインの標的リガンドの同定を含む受容体様タンパク質の機能解明は, トマトの果実発達における受容体様タンパク質の役割への新たな洞察をもたらす可能性がある.

実用化を見据えると, 本研究で同定された単為結果の原因遺伝子は, 生育の遅延や, 収量の減少, 脇芽の増加といった不良形質を伴っていることから (図 4, 2-2, 2-5, 2-6), 直接的な育種への利用は難しいと考えられる. また, 潜性の遺伝子により誘導される単為結果は遺伝子型がヘテロ接合型となる F<sub>1</sub> 品種において単為結果の形質を示さないことから, 直接の実用品種への導入は難しい. 一方, 本研究で示唆された単為結果メカニズムへの洞察は, 他のナス科の果菜類や果樹の果実形成メカニズムの解明に資すると

考えられる. *spff* 変異体の収量の減少は果実径の縮小および一果実あたりの重量の減少に起因すると考えられる (図 2-5). トマトの果実肥大は種子数との正の相関が報告されており, 単為結果果実の果実径が縮小し収量が減少することは単為結果果実の抱える課題のひとつである (Dempsey・Boynton, 1965, Gorguet et al., 2005, Groot et al., 1987, 大川, 2012). *spff* 変異体では子房壁の細胞層が減少していたことから(図2-3), 例えば, *SPFF* 遺伝子をはじめとするジベレリン関連の単為結果誘導遺伝子と, オーキシン関連の単為結果誘導遺伝子を同時に導入し, 細胞肥大と細胞分裂の両側面から果実形成を誘導することで単為結果果実の果実径を維持できる可能性が考えられる. また, TILLING 集団あるいはゲノム編集技術を用いて *SPFF* 遺伝子の弱い対立遺伝子を同定することも, 本遺伝子の実用化にむけた可能性を持つ.

#### 2-4 図表

表 2-1. 遺伝子型の決定に用いた個体の世代と表現型

Populations	The number of plants used for genotyping	
	WT phenotypes	<i>spff</i> mutant phenotypes
F <sub>2</sub> ( <i>spff</i> x ‘Micro-Tom’ WT)	15	33
F <sub>2</sub> ( <i>spff</i> x ‘Ailsa-Craig’ WT)	21	31
BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	21	9
BC <sub>3</sub> F <sub>2</sub>	23	0
BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub>	0	10
Total	80	83

F<sub>2</sub> (*spff* x ‘Micro-Tom’ WT); *spff* 変異体と ‘Micro-Tom’ 野生株との交配に由来する F<sub>2</sub> 個体群. F<sub>2</sub> (*spff* x ‘Ailsa-Craig’ WT); *spff* 変異体と ‘Ailsa-Craig’ 野生株との交配に由来する F<sub>2</sub> 個体群. BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>4</sub>; *spff* 変異体と ‘Micro-Tom’ 野生株との交配に由来する F<sub>2</sub> 個体群を ‘Micro-Tom’ 野生株に戻し交雑して得た個体群. WT phenotypes; 野生型の表現型を持つ（花の矮小化や単為結果果実の形成を伴わない）個体数. *spff* mutant phenotypes; *spff* 変異体型の表現型を持つ（花の矮小化と単為結果果実の形成を伴う）個体数. (Takei et al. 2019)

表 2-2. 第 2 章 に用いたプライマーの一覧

Primer name	primer sequence	Purpose	Information
F24	CATTCCTGAAACCCCTC	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076020</i>
R24	TCCTCAATTCTGTAAGCTGTCACT	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076020</i>
F35	AGCTACTAACACAGCCCTTGTA	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076100</i>
R35	AACAAGCAAAAATTGGCCCA	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076100</i>
F37	GCCGCAAGATAGTTCTCCAG	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076250</i>
R37	GTCACCGTGAATTCCTTGTTGG	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076250</i>
F38	ACGTTAGGGGAGAAAGTAGCT	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076320</i>
R38	AACACGTCACCTGACCCCC	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g076320</i>
F18	GCTTTCAGGTTTGCTTCCCTT	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
R18	GGACCGGAAAGTAAGT	Genotyping	mutation in <i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
F4	TGCCATTTCATCAGGGATACA	Genotyping	tomInf4732
R4	TTGGCACCATCAATCAGAAA	Genotyping	tomInf4732
F32	GCAGCTTTACCATAACCGCT	q-RT-PCR, RT-PCR	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
R32	AGGAAGCAAACTGAAAGCTTGT	q-RT-PCR, RT-PCR	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
SAND_F	TTGCTTGGAGGAACAGACG	q-RT-PCR, RT-PCR	<i>SAND (Solyc03g115810.2.1)</i>
SAND_R	GCAAACAGAACCCCTGAATC	q-RT-PCR, RT-PCR	<i>SAND (Solyc03g115810.2.1)</i>
IshF2	GGCCTATCTTCAACCATGATC	<i>in situ</i> hybridization	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
ishR1	CCCAACACTTACAACAGGC	<i>in situ</i> hybridization	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
ishT7F2	TGTAATACGACTCACTATAGGGC	<i>in situ</i> hybridization	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
ishT7R1	TGGCCTATCTTCAACCATGATC	<i>in situ</i> hybridization	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
SIXIPRNAiF1	TGTAATACGACTCACTATAGGGC	<i>In situ</i> hybridization	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
SIXIPRNAiR1	TCCCAACACTTACAACAGGC	RNAi vector construction	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
	AAATGATCACCCCTGTGTTGTTTC	RNAi vector construction	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>
	TTCCTCTGGTAATCGCCACG	RNAi vector construction	<i>Solyc04g077010 (SPFF)</i>

Primer name; プライマー名, primer sequence; プライマー配列, Purpose; プライマーの用途, Information; プライマーの位置する遺伝子名, *in situ* hybridization; *in situ* hybridization の RNA プロローブ作成の用途に用いた. (Takei et al. 2019)

表 2-3. 候補遺伝子変異と表現型の連鎖解析結果

Candidate gene	POS	The number of plants showing each genotype			
		F <sub>2</sub> plants with parthenocarp		F <sub>2</sub> plants without parthenocarp	
		m/m	+/m, +/+	m/m	+/m, +/+
<i>Solyc04g076020</i>	58548114	16/16	0/16	9/29	20/29
<i>Solyc04g076100</i>	58654936	74/78	4/78	3/5	2/5
<i>Solyc04g076250</i>	58780765	9/44	35/44	0/7	7/7
<i>Solyc04g076320</i>	58832538	73/79	6/79	3/9	6/9
<i>Solyc04g077010</i>	59564428	83/83	0/83	0/80	80/80

Candidate gene; GATK により同定された変異を持ち、連鎖解析が行われた候補遺伝子名, POS; SLL 参照ゲノム (SL2.40) 上での変異の物理位置. F<sub>2</sub> plants with parthenocarp; BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> で, *spff* 変異型の表現型を示した個体. F<sub>2</sub> plants without parthenocarp; BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>, BC<sub>3</sub>F<sub>2</sub> で, 野生型の表現型を示した個体. m/m; 遺伝子型決定に使用した個体数に対する, 変異遺伝子型をホモ接合体で持つ個体の数. +/m, +/+; 遺伝子型決定に使用した個体数に対する, 変異遺伝子型をヘテロ接合体で持つ, あるいは野生型の遺伝子型を示す個体の数. 灰色でハイライトした, *Solyc04g077010* 上に存在する物理位置 59564428 の変異は, *spff* 変異型の表現型を示した 83 個体において共通して変異遺伝子型がホモ接合体で存在し, 野生型の表現型を示した 80 個体において共通して変異遺伝子型がヘテロ接合体で存在, あるいは野生型の遺伝子型を示した. (Takei et al., 2019)

表 2-4. *spff* 変異体と 'Micro-Tom' 野生株の未受粉の雌蕊において発現量が異なる遺伝子のリスト

Gene	RPKM [WT]		RPKM [ <i>spff</i> ]		Log2FC [ <i>spff</i> /WT]	q-value	Annotation
	Average	SE	Average	SE			
<b>Up-regulated</b>							
Solyc08g080230.1	0.0	0.0	11.3	0.9	Inf	4.7E-02	Unknown Protein
Solyc02g071100.2	0.3	0.1	2.8	0.1	3.4	2.6E-02	Purine permease family protein
Solyc04g064770.1	0.5	0.3	5.1	0.2	3.4	3.8E-02	Zinc finger transcription factor 34
Solyc03g006880.2	0.3	0.1	2.9	0.1	3.4	9.3E-03	SIGA20ox1
Solyc01g106750.1	0.4	0.0	1.8	0.0	2.2	1.4E-02	Unknown Protein
Solyc11g066600.1	2.0	0.2	6.5	0.2	1.7	3.1E-02	Serine carboxypeptidase S28 family protein
Solyc01g107490.1	1.3	0.1	3.8	0.1	1.6	3.8E-02	BHLH transcription factor family
Solyc01g090460.2	3.5	0.2	10.0	0.1	1.5	9.3E-03	HD-ZIP family
Solyc06g073750.2	0.8	0.1	2.2	0.1	1.4	3.8E-02	Beta-D-glucosidase
Solyc04g080720.2	7.5	0.3	16.9	0.3	1.2	1.4E-02	Transferase family protein
Solyc04g074740.2	6.6	0.1	14.3	0.2	1.1	2.7E-03	Blue copper-like protein
Solyc06g083080.2	37.0	1.6	78.6	2.8	1.1	4.7E-02	Unknown Protein
Solyc05g014710.2	11.4	0.7	24.1	0.4	1.1	3.1E-02	Remotin family protein
<b>Down-regulated</b>							
Solyc02g078150.2	25.2	0.8	2.1	0.3	-3.6	9.3E-03	Plant-specific domain TIGR01615 family protein
Solyc02g092550.2	8.7	0.2	0.9	0.3	-3.2	1.8E-02	LOB domain protein
Solyc03g120990.2	13.5	0.7	1.9	0.4	-2.8	3.8E-02	Malic enzyme
Solyc00g049520.2	9.0	0.1	1.4	0.2	-2.7	5.5E-03	Unknown Protein
Solyc01g107190.2	28.8	0.9	5.6	0.4	-2.4	1.4E-02	LOB domain protein
Solyc12g094620.1	312.4	15.3	69.7	5.9	-2.2	3.8E-02	catalase
Solyc11g008440.1	100.7	5.2	28.9	1.3	-1.8	4.5E-02	Amino acid transporter
Solyc02g086700.2	1.4	0.0	0.4	0.0	-1.7	3.8E-02	Beta-1 3-glucanase
Solyc05g005150.1	30.4	0.5	10.3	1.5	-1.6	4.7E-02	F-box/keich repeat-containing F-box family protein
Solyc00g009090.2	2.6	0.1	1.0	0.1	-1.4	1.7E-02	Receptor like kinase, RLK
Solyc10g076200.1	456.9	11.8	181.0	12.9	-1.3	3.5E-02	Non-specific lipid-transfer protein
Solyc02g090400.2	4.7	0.2	2.0	0.1	-1.3	3.8E-02	Myb family transcription factor

Gene; 遺伝子番号, Up-regulated, F<sub>2</sub>集団の *spff* 変異体型個体の子房において 'Micro-Tom' 野生株と比較して発現量が高かった遺伝子のリスト, Down-regulated, F<sub>2</sub>集団の *spff* 変異体型個体の子房において 'Micro-Tom' 野生株と比較して発現量が低かった遺伝子のリスト, Average, 生物学的反復を 3 回行った RPKM 値の平均値, SE; 生物学的反復を 3 回行った RPKM 値の標準誤差 (RPKM; Reads per kilobase of transcript per million of mapped reads). Log2FC[*spff*/WT]; *spff* 変異体型の子房と 'Micro-Tom' 野生株の RPKM の Log<sub>2</sub> 値の変化率, annotation; 遺伝子アノテーション. 灰色でハイライトした遺伝子 *SIGA20ox1* について本文で言及した. (Takei et al. 2019)

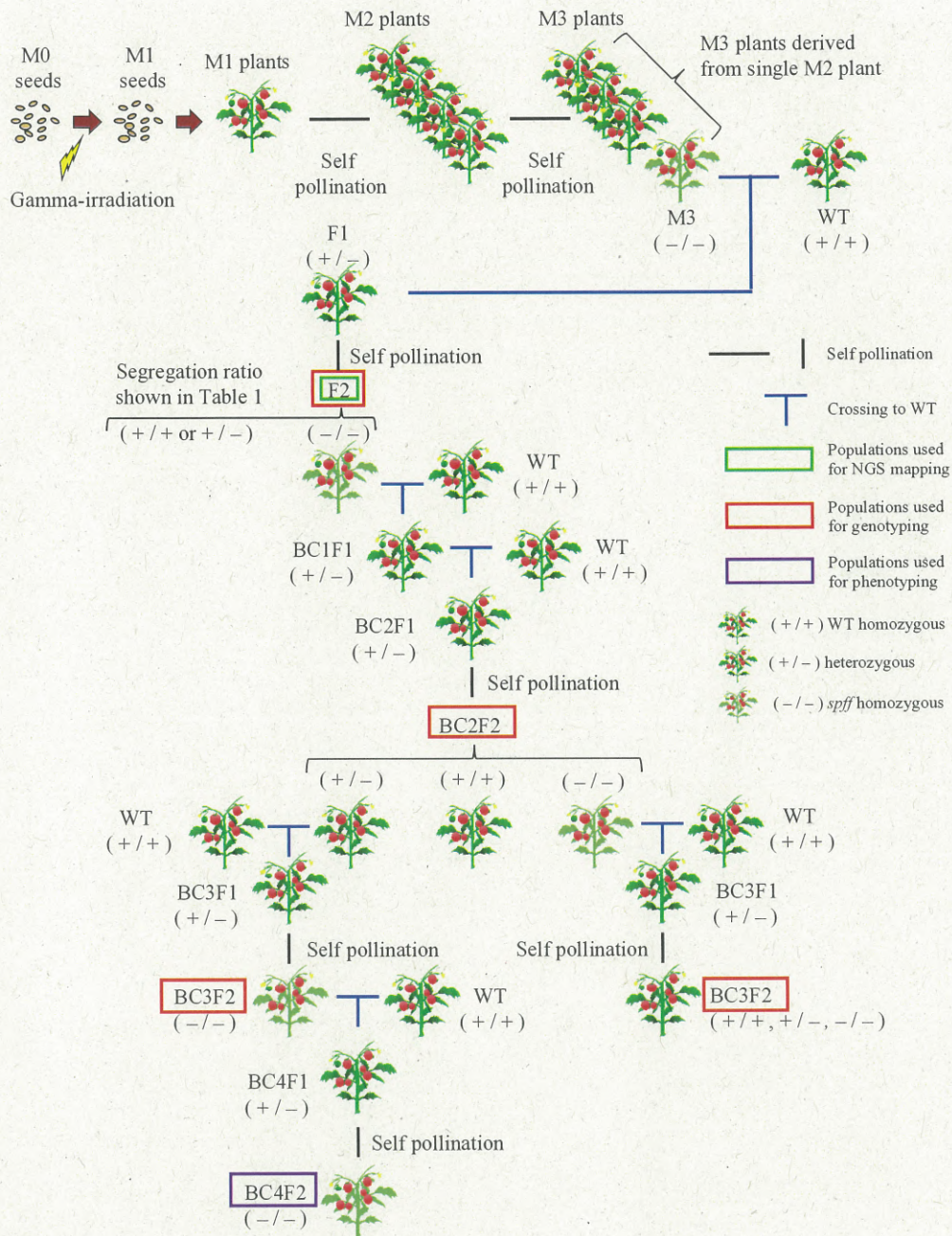


図 2-1 ‘Micro-Tom’ 野生株による *spff* 変異体の戻し交配個体の作出

‘Micro-Tom’ 突然変異集団から得られた M<sub>3</sub> 植物より、単為結果性を示す TOMJPG4121 が得られた。‘Micro-Tom’ 野生株に対して BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub> 集団まで戻し交雑を行い、ガンマ線照射によって誘発されたバックグラウンド変異を除去した。括弧内の記号は *spff* 変異の遺伝子型を表す。BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub> 世代以降の各個体の遺伝子型は、F18-R18 のプライマーセットを用いて決定した。(+/+); 野生型, (+/-); ヘテロ接合体, (-/-) ホモ接合体。赤枠で示した集団は連鎖解析に使用され、紫色の枠で示した集団は *spff* 変異体の表現型の特徴付けに使用された。(Takei et al. 2019)



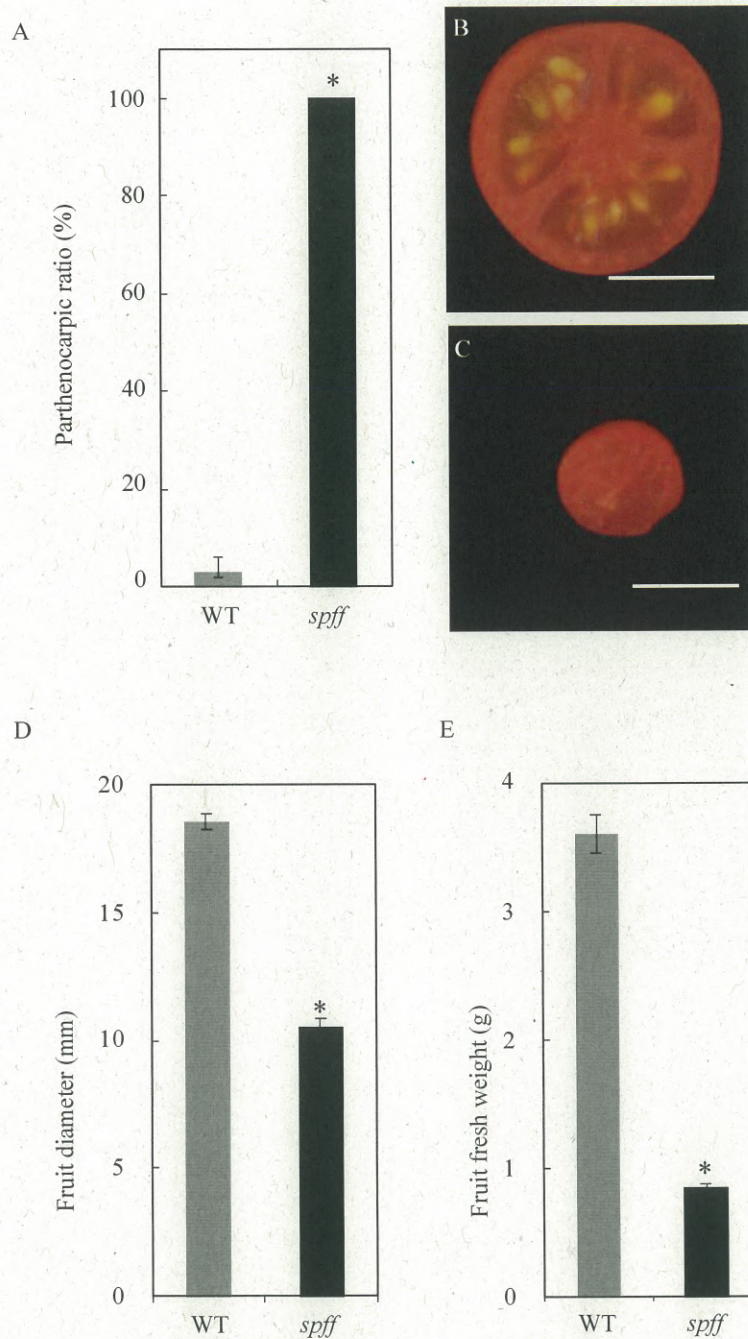


図 2-2. *spff* 変異体の果実の表現型観察結果

(A) 受粉作業なしで栽培した場合の、'Micro-Tom' 野生株 (WT) と *spff* 変異体に着果した総果実数における単為結果果実の割合. (B) 'Micro-Tom' 野生株の果実の横断面. (C) *spff* 変異体の単為結果果実の横断面. (D) 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の果実直径. (E) 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の果実の生鮮重. スケールバー = 1 cm. *spff* 変異体の単為結果果実は果実径が小さく、一果実あたりの重さが軽いことが定量的に示された. (Takei et al., 2019)

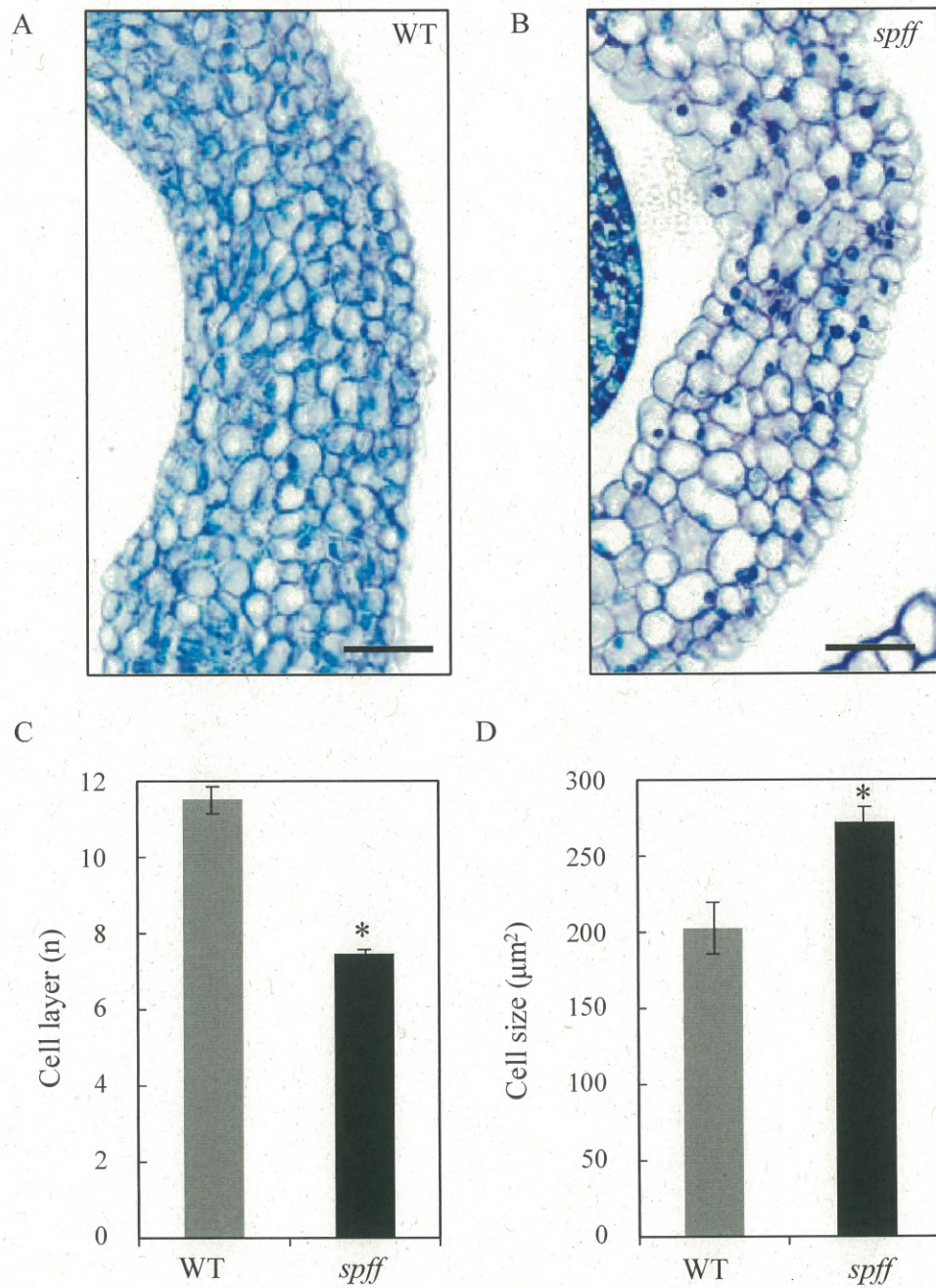


図 2-3. 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の子房壁の組織断面

(A) 'Micro-Tom' 野生株の子房壁の横断面, (B) *spff* 変異体の子房壁の横断面, (C) 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の子房壁の細胞層数, (D) 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の子房壁の細胞サイズを示す. スケールバー = 30 µm. 3 回以上の生物学的反復を行った. アスタリスクは 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の有意差を示す (Student の *t* 検定,  $p < 0.01$ ). (Takei et al. 2019)

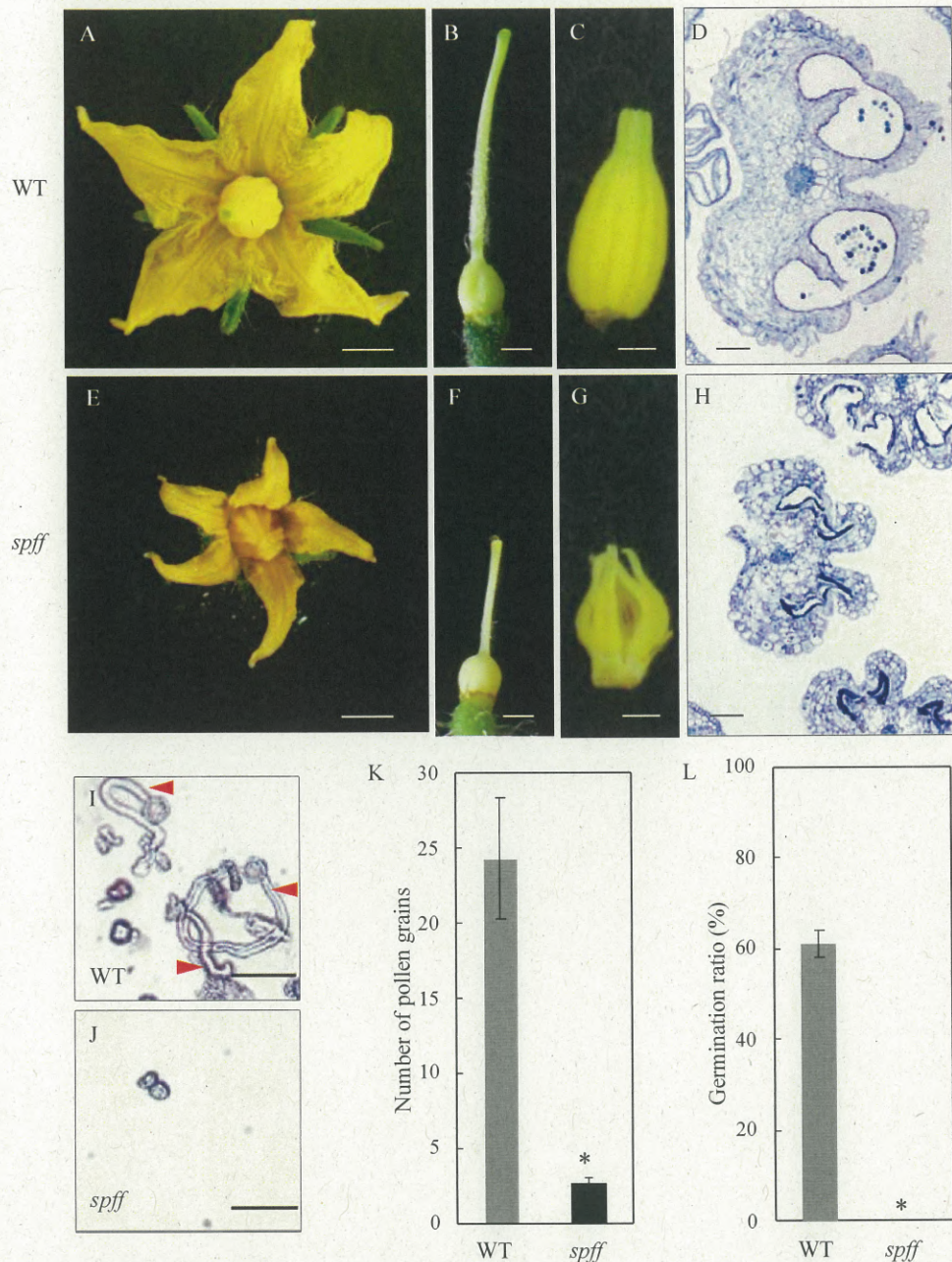


図 2-4. *spff* 変異体の生殖器官の表現型

‘Micro-Tom’ 野生株(A-D)と *spff* 変異体(E-H)の花弁(A,E), 雌しべ(B,F), 並びに葯(C,G)の形態, および ‘Micro-Tom’ 野生株(G)と *spff* 変異体(H)の葯の組織横断切片を示す. (I) 花粉発芽培地上での ‘Micro-Tom’ 野生株の花粉管伸長の検鏡結果, 赤矢印は花粉管を示す. (J) *spff* 変異体の花粉発芽培地上での花粉粒, (K) 検鏡下で観察された花粉粒の数, (L) 総花粉数あたりの花粉管を伸長させた花粉数 (花粉の発芽率) を示す. スケールバー = 2 mm (A,E); 1 mm (B,C,F,G); 100  $\mu$ m (D,H); 50  $\mu$ m (I,J). 定量実験には, 3 回以上の生物学的反復を実施した. アスタリスクは ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の有意差を示す (Student の *t* 検定,  $p < 0.01$ ). (Takei et al. 2019)

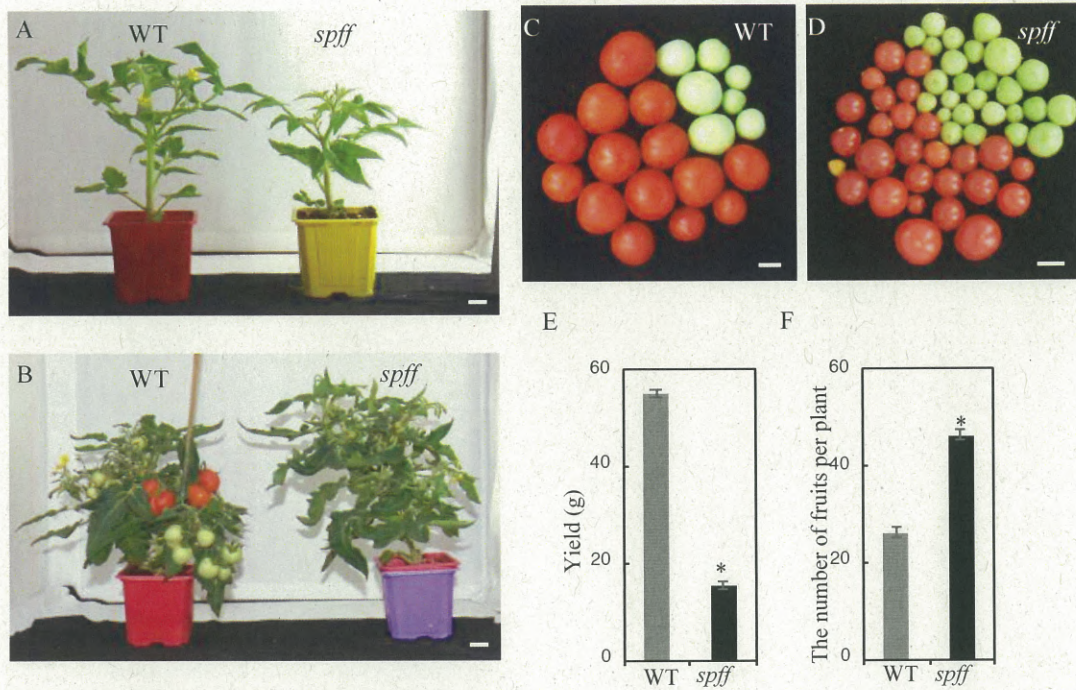


図 2-5. *spff* 変異体の収量評価

‘Micro-Tom’ 野生株 (左) と *spff* 変異体 (右) の (A) 播種 40 日後の植物の草姿および、(B) 播種 66 日後の草姿を示す。 *spff* 変異体は ‘Micro-Tom’ 野生株よりも成長が遅延した。スケールバー = 1 cm. (C) 播種 112 日後の ‘Micro-Tom’ 野生株、および (D) 播種 173 日後の *spff* 変異体から収穫された全果実を示す。播種 112 日後の ‘Micro-Tom’ 野生株、播種 173 日後の *spff* 変異体、それぞれから収穫された (E) 赤熟果実の合計生鮮重および、(F) 総果実数を示す。定量実験には 3 回以上の生物学的反復を行った。アスタリスクは ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の有意差を示す (Student の *t* 検定,  $p < 0.01$ ). (Takei et al. 2019)

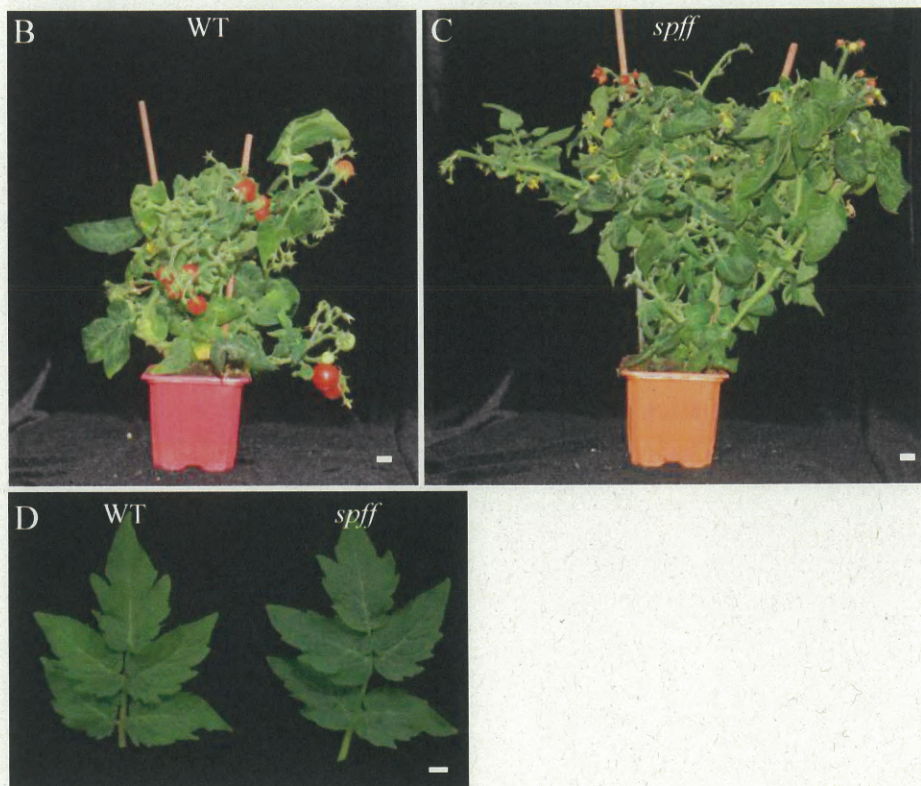
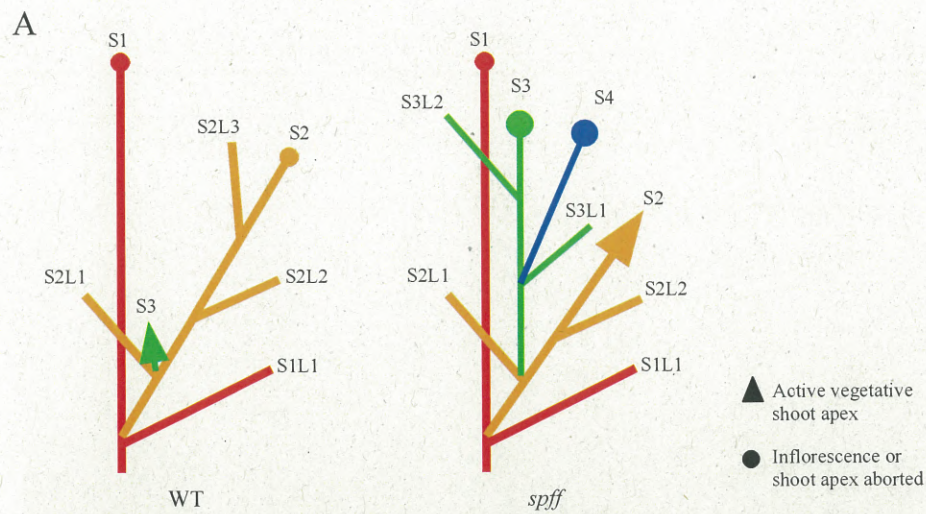


図 2-6. ‘Micro-Tom’ 野生株と *spff* 変異体の脇芽の枝分かれ形態の比較

(A) ‘Micro-Tom’ 野生株 (左) と *spff* 変異体 (右) の脇芽と花序の発生パターンを示すモデル図. ‘Micro-Tom’ 野生株 (B) と *spff* 変異体 (C) の平均的な草姿. (D) ‘Micro-Tom’ 野生株 (左) と *spff* 変異体 (右) の成熟葉の形態. *spff* 変異体では成熟葉の色や鋸歯を含む形態に発達異常は見られなかった. また, *spff* 変異体でのアントシアニンの過剰蓄積も見られなかった. スケールバー = 1cm. (Takei et al. 2019)

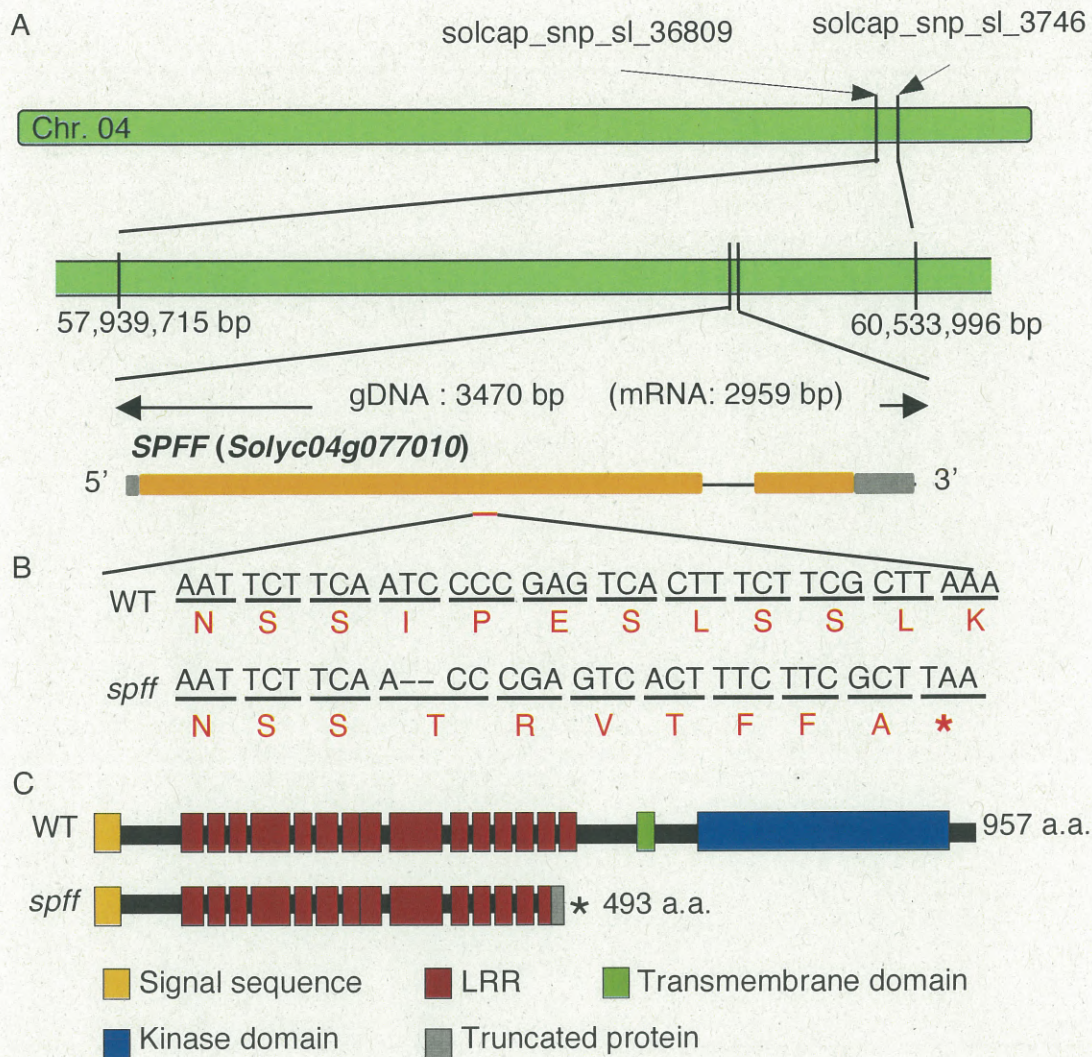


図 2-7. *Solyc04g077010* の遺伝子構造

(A) *Solyc04g077010* の第 4 染色体上の位置と ITAG3.2 により予測された遺伝子構造. 4 番染色体を緑の太線で示し, 遺伝子のうち翻訳されない領域を灰色, イントロンで区切られたエクソンを橙色で示す. (B) 変異付近の 'Micro-Tom' 野生株および *spff* 変異体の塩基配列とアミノ酸配列. 上段の黒文字は塩基配列を, 下段の赤文字はアミノ酸配列を示す. *spff* 変異体に存在する 2 bp の欠失はハイフンで示す. 2 bp の欠失変異は, *spff* 変異体では第一エクソンに終止コドンを生じる. (C) *Solyc04g077010* でコードされた受容体様タンパク質のアミノ酸の推定長とドメイン構造. 赤はロイシンリッチリピートドメイン, 緑は幕貫通ドメイン, 青はキナーゼドメインを示す. (B) (C)ではアスタリスクは終止コドンを示す. (Takei et al. 2019)

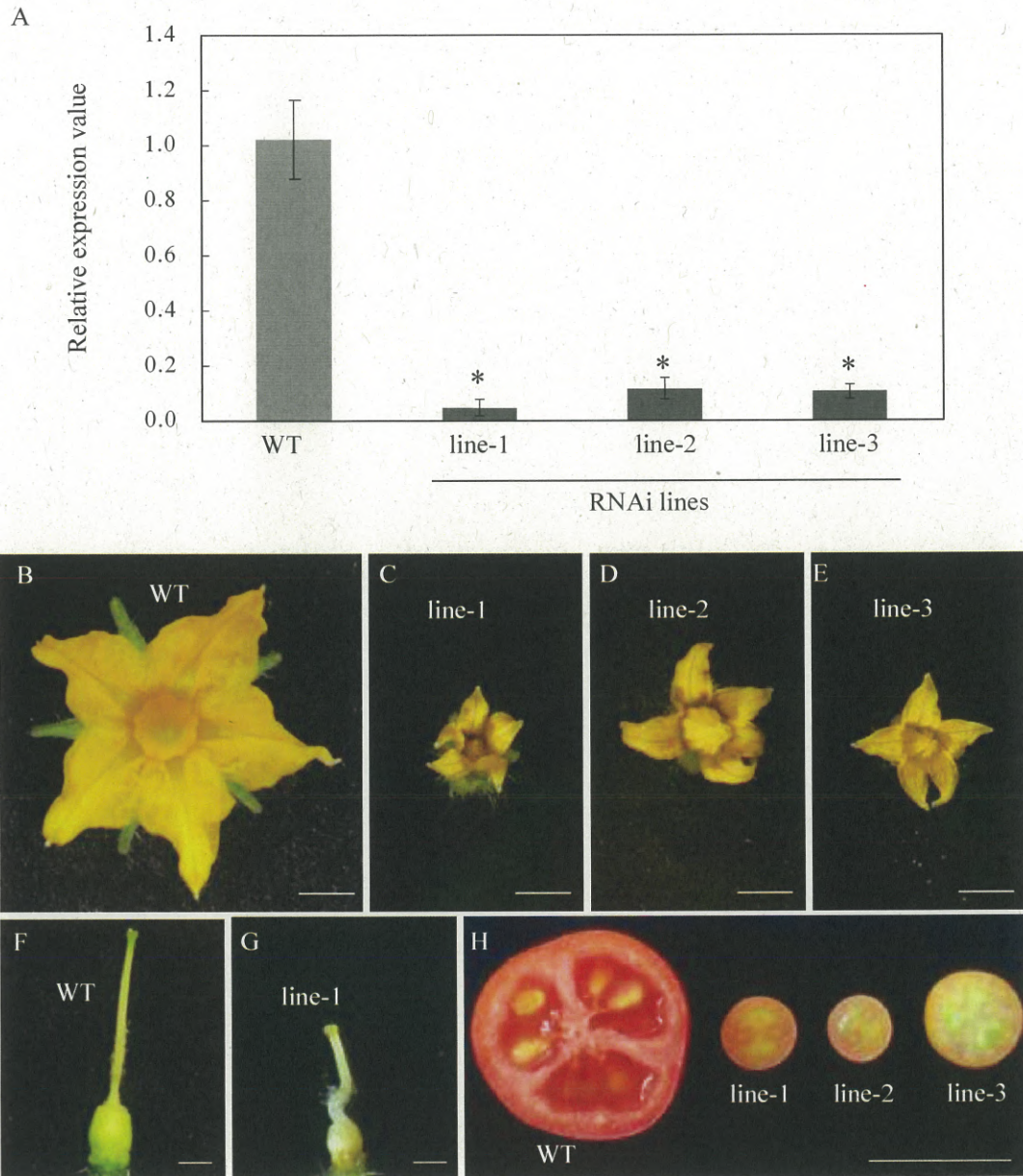


図 2-8. 形質転換により作出された RNAi による *Solyc04g077010* 発現抑制系統とその表現型

(A) ‘Micro-Tom’ 野生株および RNAi 系統の葉における *Solyc04g077010* の発現解析結果. ‘Micro-Tom’ 野生株(B)および *Solyc04g077010* 発現抑制系統の line-1 (C), line-2 (D), line-3 (E) の花の形態. ‘Micro-Tom’ 野生株 (F) および *Solyc04g077010* 発現抑制系統 line-1 (G) の雌しべの形態. (H) 受粉により形成された ‘Micro-Tom’ 野生株の果実 (左) および, 単為結果した 3 つの *Solyc04g077010* 発現抑制系統果実 (右). スケールバー = 2 mm (B-E); 1 mm (F,G); 1 cm (H). 定量には 3 回以上の生物学的反復を実施した. アスタリスクは ‘Micro-Tom’ 野生株と *Solyc04g077010* 発現抑制系統の標的遺伝子発現量の有意差を示す (Student の  $t$  検定,  $p < 0.01$ ). (Takei et al. 2019)

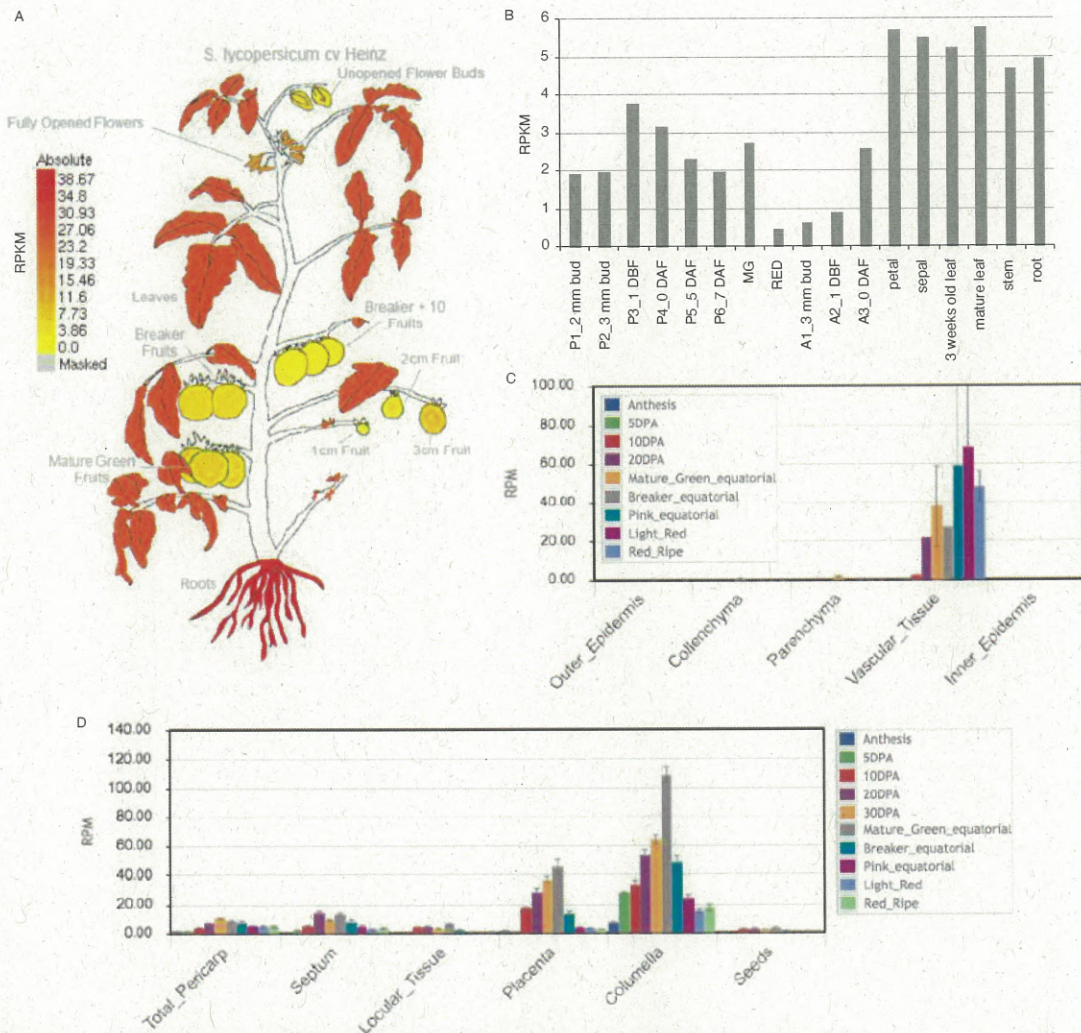


図 2-9. トマトの器官、組織、細胞における *SPFF* の発現パターン

(A) 'Heinz 1706' での *SPFF* の発現パターン (tomato eFP ブラウザ (Winter et al., 2007)), (B) 'Micro-Tom' 野生株での *SPFF* 遺伝子の発現パターン (Ezura et al., 2017) P1-6; 雌しべ, MG; 開花 33 日後の緑熟果実, RED; 開花 44 日後の赤色果実, A1-3; 葯, DBF; 開花前日数, DAF; 開花後日数. (C) M82 の果皮細胞ならびに (D) M82 の果実組織における *SPFF* 遺伝子の発現パターン (Tomato Expression Atlas (Fernandez-Pozo et al., 2017, Shinozaki et al., 2018)) DPA; 開花後日数, RPKM; Reads per kilobase of transcript per million of mapped reads, RPM; Reads per million of mapped reads (Takei et al. 2019)



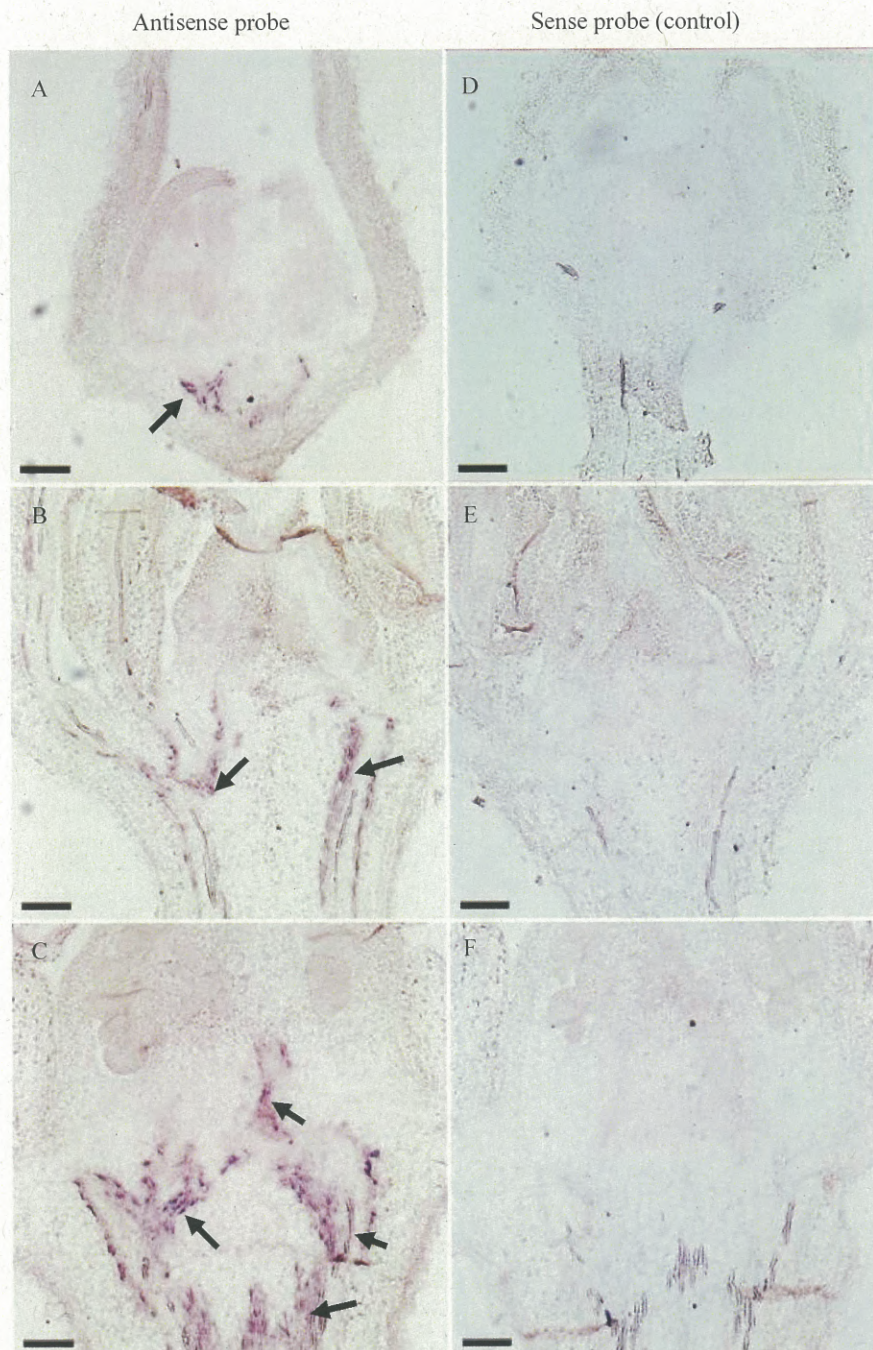


図 2-10. 発達中の蕾における *Solyc04g077010* 転写産物の発現分布 (*in situ* ハイブリダイゼーション)

1.1 mm (A,D), 2.9 mm (B,E), 4.5 mm (C,F) の蕾において、アンチセンスプローブ(A-C)で *Solyc04g077010* の発現のシグナルを検出し、コントロールとしてセンスプローブ (D-F) でバックグラウンドを検出した。矢印は維管束で検出された標的遺伝子発現を示す。花托の維管束、および柱軸で発現シグナルが観察された。スケールバー = 100  $\mu$ m. (Takei et al. 2019)

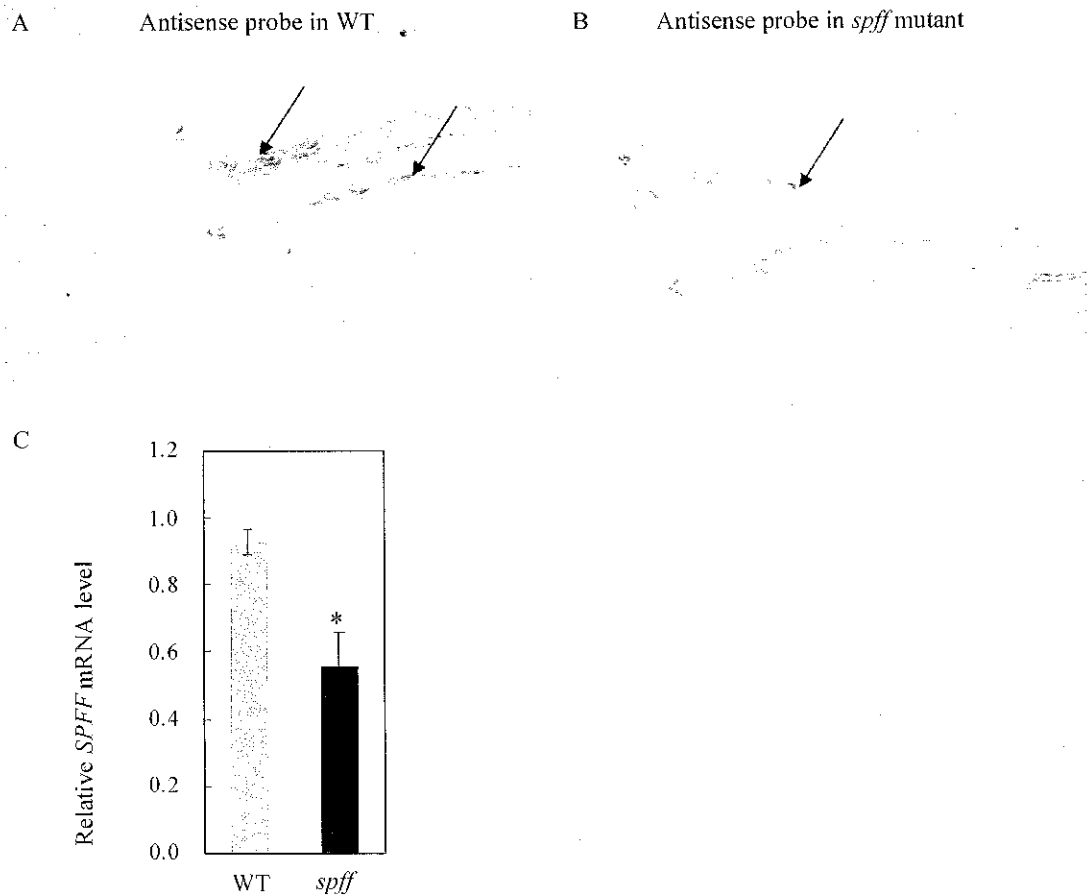


図 2-11. *spff* 変異体における *Solyc04g077010* の mRNA の発現抑制

(A) *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出された, *Solyc04g077010* の転写産物. アンチセンスプローブを用いて検出された *Solyc04g077010* の mRNA のシグナル強度は, 'Micro-Tom' 野生株 (A) よりも *spff* 変異体 (B) で弱かった. 矢印は花托の維管束で検出された発現シグナルの分布を示す. スケールバー = 100  $\mu$  m. (C) 成熟葉における *Solyc04g077010* の mRNA 量の qRT-PCR による定量結果. *Solyc04g077010* の転写レベルは, 'Micro-Tom' 野生株と比較して *spff* 変異体で有意に低かった. 定量実験には 3 回以上の生物的反復を行った. アスタリスクは 'Micro-Tom' 野生株と *spff* 変異体の有意差を示す (Student の *t* 検定,  $p < 0.01$ ). (Takei et al. 2019)

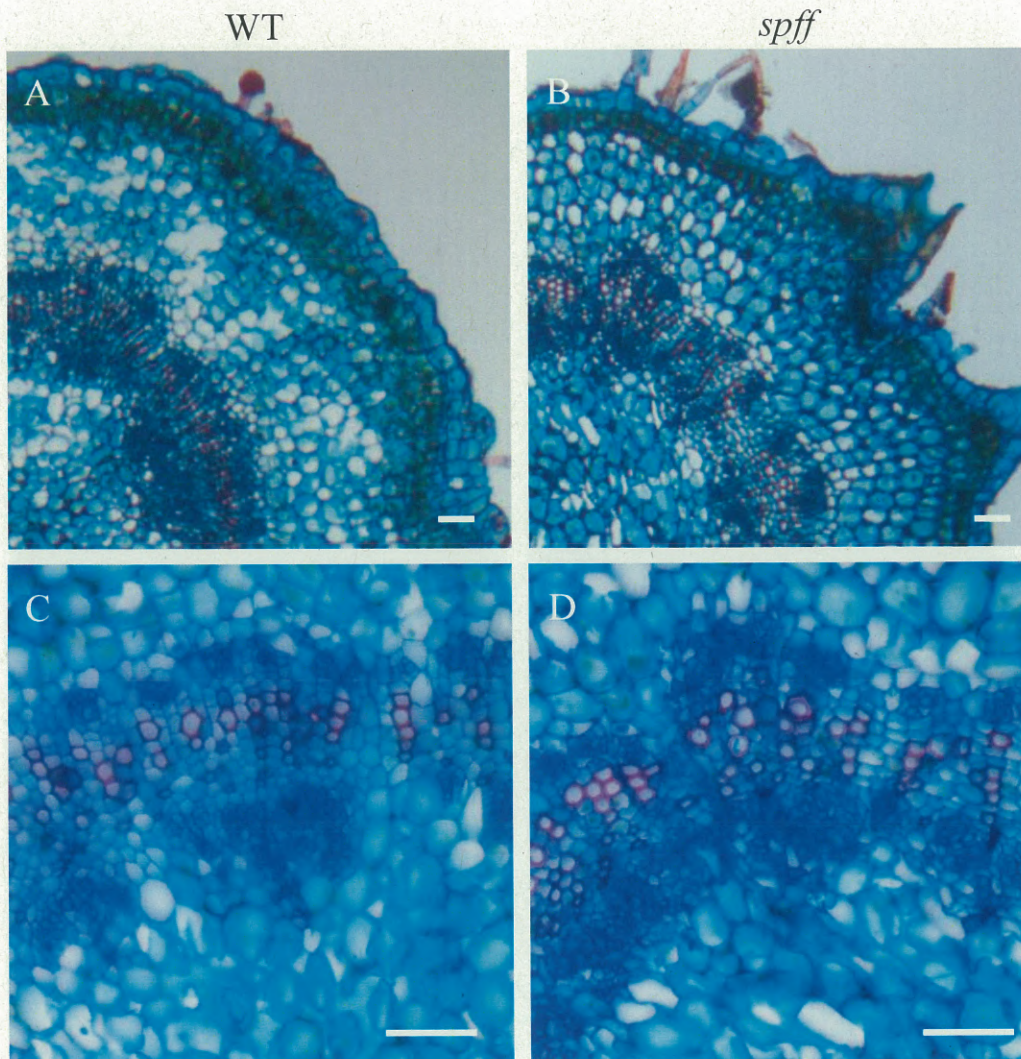


図 2-12. *spff* 変異体の花托における維管束の組織横断面切片  
 サフラニンとアストラブルーの二重染色により, 'Micro-Tom' 野生株 (A, C) と *spff* 変異  
 体 (B, D) の開花当日の花托の維管束を染色した. スケールバー = 50  $\mu\text{m}$ . (Takei et al.  
 2019)

# 総合考察

## 総合考察

トマトは、ビタミン、ミネラル、食物繊維の豊富な供給源として、世界的に栽培されている最も重要な園芸作物のひとつである。トマトを効率よく、かつ安定的に生産し安価で消費者に届けることは、消費者の栄養改善に寄与する。そのため、トマトの種子生産と果実生産の両側面において、労働負担の大きい作業項目の省力化を図ることが求められている。本研究では、トマトの $F_1$ 採種時における除雄作業と、果実生産時における受粉作業に着目し、それぞれの作業の省力化に寄与する基盤技術の開発を目的とした。具体的には、第1章では、除雄作業の要らない採種を実現するため、CMSを用いた $F_1$ 採種システムの構築を目指した。第2章では、受粉作業の要らない果実生産を実現するため、単為結果メカニズムの一端を解明することによる新規の着果制御技術の発見を目指した。

第1章では、CMS トマトを利用した除雄の要らない $F_1$ 採種システムの構築において、花粉親と種子親がそれぞれ抱える課題の解決を目的とした。まず、花粉親の課題は、果菜類のCMSを用いた $F_1$ 採種を実用化するために必要な稔性回復遺伝子 (*Rf* 遺伝子) が未同定であるために、花粉親の効率的な育種が困難であるということであった。本研究では、まず、*Rf* 遺伝子を持つとされる2つの *Rf* 系統 ‘LA1670’ (*S. pimpinellifolium*) 並びに ‘LA1673’ (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) の全ゲノムの配列情報を解読し、参照ゲノムを構築した。その結果、栽培種トマト *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* ‘Heinz 1706’ の最新の参照ゲノムサイズ 782.5 Mb (SL4.0) とほぼ同程度のゲノムサイズ (‘LA1670’ = 808.8 Mb, ‘LA1673’ = 804.5 Mb) の参照ゲノムを構築することができた (表 1-9, 表 1-10, 図 1-3)。さらに BUSCO を用いてゲノムアセンブリの完成度を評価した結果、各 *Rf* 系統の参照ゲノムに存在する陸上植物のコアジーン割合は、それぞれ 96.2% と 96.5% であり、SL4.0 に存在する陸上植物のコアジーン割合 97.5% に迫る高精度な参照ゲノムを得ることができた (表 1-12)。構築した参照ゲノムは *Rf* 候補遺伝子を同定するのに十分な精度であると考えられた。次に、*Rf* 候補遺伝子の同定に向けて、7つの異なる発達段階の葯および花粉を含む植物体の複数の器官別組織サンプルを用いた遺伝子発現解析を行った (表 1-14)。その結果、それぞれの系統で 29,629 個と 29,185 個を発現遺伝子 (TPM > 0) として同定した (表 1-16)。*Rf* 遺伝子は雄性器官で機能すると考えられるため、これら遺伝子のなかに *Rf* 遺伝子が含まれると考えられた。

参照ゲノムを構築した2系統のRf系統のうち、'LA1670' (*S. pimpinellifolium*) を代表的なRf系統として選び、'LA1670' (*S. pimpinellifolium*) の参照ゲノムと遺伝子アノテーション情報を用いて、Rf遺伝子の座乗領域の推定と、候補遺伝子の同定を行った。まず、Rf遺伝子座を取得するため、Rf系統'LA1670'とCMS系統'CMS[MSA1]品種A\_BC7'を交配してF<sub>2</sub>集団作出し、F<sub>2</sub>集団全個体のddRADシーケンスを実施した。その結果、

[REDACTED]

つまり、本領域内で'LA1670'と栽培種トマト間で多型を示すDNAマーカーを作成し、遺伝子型を識別することで、花粉親の育種に於いてRf遺伝子を持つ個体の効率的な選抜が可能になる。

Rf遺伝子を持つ個体をさらに効率的に選抜するためには、Rf遺伝子の同定が必須である。本研究では、Rf遺伝子の同定に向けて、上述の座乗領域内でRf遺伝子の候補となる遺伝子を限定した。まず、

[REDACTED]

[REDACTED]

なおその際、  
‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ は草丈が栽培品種と同程度の生長をし、屋内の栽培室では栽培できないため、遺伝子組換えした形質転換体の栽培施設が実験遂行上の課題となる。私は博士課程在学期間中に第 2 章でも用いた矮性トマト品種 ‘Micro-Tom’ を花粉親として ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC7’ の戻し交雑を行い、植物体の矮性に重点を置いた個体選抜を行って、‘Micro-Tom’ で 4 回連続戻し交雑を行った ‘CMS[MSA1]Micro-Tom\_BC4’ を作出した。‘CMS[MSA1]Micro-Tom\_BC4’ は ‘Micro-Tom’ 野生株と同程度の草丈 (矮性) を示すため、形質転換体が栽培できる屋内の栽培室 (筑波大学 生物農林学系 E 棟 505 室, 第二エリア 2D 棟 323 室) での *Rf* 遺伝子の検証実験が可能である。また、‘Micro-Tom’ が *Rf* 遺伝子を保有しないことを確かめるため、ピンセットを用いて人工的な自家受粉を行い種子ができない不稔性を確認した。今後、*Rf* 同定の研究に ‘CMS[MSA1]Micro-Tom\_BC4’ を活用するためには、アニリンブルー染色等によるさらなる雄性不稔性の検証が必要である。加えて、*Rf* 遺伝子が栽培室の環境下でも花粉稔性を回復できるかどうかの確認 (‘CMS[MSA1]Micro-Tom\_BC4’ を *Rf* 系統と交配して  $F_1$  個体を作成し、その花粉稔性を観察する等) や、細胞質が特異な ‘CMS[MSA1]Micro-Tom\_BC4’ に対して ‘Micro-Tom’ 野生株と同様の形質転換技術を適用できるかどうかの検証も必要である。

次に、CMS トマトを利用した  $F_1$  採種システムの構築における種子親の課題は、トマトの花の構造が、筒状の葯が柱頭を覆う形をしており、除雄なしでは種子親の柱頭に花粉親の花粉が付着しにくいということであった。本研究では、柱頭を遺伝的に露出させた CMS 系統を種子親として、花粉親との交配をクロマルハナバチによって行う  $F_1$  種子生産モデルを構想し、その実現可能性を検証した。

まず、実験に用いる系統を作成した。柱頭の露出する ‘品種 B’ 並びに ‘IL2-5’ を維持系統として利用し、柱頭の露出する 2 系統の CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’

並びに ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’ を作出した (図 1-9, 図 1-11). 比較対象として, 柱頭の露出しない ‘品種 A’ 並びに ‘M82’ を維持系統として, 柱頭の露出しない 2 系統の CMS 系統 ‘CMS[MSA1]品種 A\_BC8’ 並びに ‘CMS[MSA1]M82\_BC3’ を作出した (図 1-8, 図 1-9). クロマルハナバチを用いた採種実験を行った結果, 柱頭の露出しない CMS 系統では,  $F_1$  採種数 (1 株当たり  $F_1$  採種数) が従来の手交配の手法と比べて 0.1% 程度に著しく減少した (表 1-20, 表 1-21, 図 1-13). この結果から, クロマルハナバチの体表面に付着した花粉親由来の花粉が, 葯に覆われた柱頭にはほとんど付着しないことが示唆された. 一方で, 柱頭露出型 CMS 系統である ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ では, クロマルハナバチによる交配でも従来の手交配の手法と同程度の  $F_1$  採種数 (1 株当たり  $F_1$  採種数) が得られた (表 1-22, 図 1-13). これは柱頭の露出により, クロマルハナバチの体表面に付着した花粉親由来の花粉が柱頭に付着しやすくなったことに加え, 自家の不稔花粉が柱頭を覆いにくくなったことに起因する可能性が考えられる. 以上より, 柱頭を露出させた CMS 系統を種子親とした場合に, トマトの CMS 系統と訪花昆虫を用いた  $F_1$  種子の採種の実現可能性を示唆する結果を得ることができた. しかし昆虫を用いた実験の結果は気象条件等に左右されることもあるため, 今後, 反復実験により再現性を確認する必要がある. また, 同じく柱頭露出する CMS 系統 ‘CMS[MSA1]IL2-5\_BC3’ は, 非柱頭露出型の 2 系統ほどではないものの, 採種数の減少が見られた (表 1-23, 図 1-13). この原因は不明だが, 維持系統の香気成分の違いによるハチの嗜好性の違いや, ハチの引き寄せに関する視覚的なシグナルであるガイドマークの強さの違い, あるいは柱頭の大きさによる採種効率の違い等が影響した可能性があり, 今後検証していく余地がある. また, ハチの嗜好性が採種数に大きな影響を与える場合, 採種現場である ASEAN を始めとした新興国の地域に即したハチを用いて, ハチの嗜好性をも加味した種子親系統の育種が求められる. 例えば, 採種現場で用いられるハチが好んで訪花するトマト品種に対して, 柱頭露出と CMS を戻し交雑で付与する等の育種の可能性が考えられる.

なお,  $F_1$  品種における柱頭の露出は自殖効率の低下ひいては着果不良をもたらすため,  $F_1$  採種の種子親の柱頭露出は潜性の遺伝子変異により制御されていることが望ましい. それに対して, 本実験に用いた ‘品種 B’ の柱頭露出は潜性の可能性があり,  $F_1$  品種でも安定した自殖が可能である. そのため, ‘品種 B’ に柱頭露出をもたらす遺伝子変異



を同定し、DNA マーカーを開発することができれば、CMS を用いた F<sub>1</sub> 採種システムに親系統として用いる柱頭露出型 CMS 系統の育種現場に大きく貢献することができる。

本研究ではさらに、‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ を種子親に用いた F<sub>1</sub> 採種で要した受粉のコストを、従来型の手交配とクロマルハナバチを用いた交配でそれぞれ算出した。その結果、手交配では 1 粒あたりの採種に要した受粉のコストが 8.95 円であるのに対し、クロマルハナバチを交配に用いた場合では 16.82 円であった。しかし、本研究では、実験規模が小さかったために、実験に用いるクロマルハナバチを最小単位 (1 箱) 購入したのち、マルハナバチの個体数を間引く作業を行った。そのためにマルハナバチの購入経費を育成株数や採種数で割った際に、割高な値が算出された。そのため、今後、クロマルハナバチの最小単位である 1 箱あたりの作業株数にスケールアップした場合の採種数と採種コストの検証実験が必要である。尚、本研究で算出した理論値では、スケールアップした場合にはクロマルハナバチによる 1 粒あたりの受粉コストが 0.40 円に低下した。このことから、柱頭露出型 CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 採種が採種コストの低減に寄与する可能性は十分に考えられる。

第 2 章では、受粉作業の要らない果実生産を実現するため、単為結果メカニズムの一端を解明することによる新規の着果制御技術の発見を目指した。既存の単為結果性品種は、果実が裂けてしまう、軟化してしまう、といった不良形質を伴うため、本研究では新規の単為結果性変異体を対象として、単為結果をもたらす遺伝子の同定と、同定した遺伝子をもたらす単為結果メカニズムの一端の解明を行った。まず、連鎖解析を用いた候補遺伝子の同定と、RNAi 法を用いた候補遺伝子の検証により、*Solyc04g077010* 上の 2 bp の欠失変異が単為結果をもたらすことを証明した (表 2-3, 図 2-7, 図 2-8)。

*Solyc04g077010* を *SPFF* 遺伝子として同定し、当該変異を *spff* 変異と命名した。*SPFF* 遺伝子は受容体様タンパク質をコードし、*spff* 変異はフレームシフトにより *SPFF* タンパク質の機能を欠損していたことがわかった (図 2-7)。*spff* 変異を実際の単為結果育種に活用したい場合、本研究に用いた *SPFF* 遺伝子上の *spff* 変異を識別する遺伝子マーカー (F18 と R18 のプライマーセット) は、単為結果性を持つ新規系統の育種に利用することができる (表 2-2)。

しかし、本研究で同定された単為結果の原因遺伝子は、生育の遅延や、収量の減少、脇芽の増加といった生産上望ましくない形質を伴っていることから (図 4, 図 2-2, 図

2-5, 図 2-6), 直接的な育種への利用は難しいと考えられる. また, *spff* 変異による単為結果は潜性に遺伝するため, 遺伝子型がヘテロ接合型となる F<sub>1</sub> 品種においては単為結果の形質が表れない. このことから実用品種に本遺伝子を導入する育種利用は難しいと考える. そのため, 本研究で同定した遺伝子の機能解明に基づいて新規の単為結果や果実形成のメカニズムを解明し, 着果制御に応用していくことが今後求められる. 本研究では, *spff* 変異体においては, トマトの果実形成に重要な役割を持つジベレリンの生合成を促進する *GA20ox1* の未受粉子房での高発現や, ジベレリン応答反応の証となる子房壁の細胞肥大が観察された (表 2-4, 図 2-3). ジベレリン代謝の活性化がトマトの果実形成を促すことは先行研究からも報告されており, *spff* 変異体においてもジベレリン応答の活性化に起因して単為結果が引き起こされている可能性が強く示唆された (Serrani et al., 2008, Shinozaki et al., 2015). しかし, *SPFF* 遺伝子による着果制御機構が既存の単為結果パスウェイに結びつくか, あるいは完全に新規のパスウェイで単為結果誘導が引き起こされているか, は今後解明の余地がある. 結びつきうる既存の単為結果パスウェイの候補としては, *MADS BOX* 遺伝子の機能抑制による雄蕊の初期発達異常を介した単為結果誘導が挙げられる. 本研究により示された *spff* 変異体の強い雄性不稔は, 先行研究で報告された雄性不稔を伴う単為結果変異体と一致する可能性がある (Pnueli et al., 1994, Ampomah-Dwamena et al., 2002, Mazzucato et al., 2008, Quinet et al., 2014, Okabe et al., 2019, Hao et al., 2017, Rojas-Gracia et al., 2017) (図 2-4). これらの結果は, *SPFF* 遺伝子によりコードされた受容体様タンパク質が受粉前の生殖器官のジベレリン応答を抑制するように機能していることを示唆し, また, *spff* 変異体では雄性器官の発達異常と雄性不稔を介して *GA20ox1* の過剰な発現を促進したことを示唆した. しかし, 花の構造を決定する各種 *MADS BOX* 遺伝子群と *SPFF* 遺伝子の関連付け, およびそれらが *GA20ox1* 遺伝子の発現調節に関与するメカニズムには, さらなる実験と解明が必要とされている. 一方, これまで報告のない新規のパスウェイで単為結果誘導が引き起こされている可能性も完全には否定できない. これまで, トマトの単為結果を誘導する遺伝子が主に雄蕊や雌蕊での発現が報告されてきたのに対し, 本研究で行った *in situ* hybridization は *SPFF* 遺伝子が発達中の蕾の花托の維管束で高い発現を示すことを明らかにした (図 2-10). これまでトマトの単為結果や果実形成に関与する遺伝子が維管束で高発現している例は報告されていなかったが, 花托の維管束は雄性/雌性の生殖器官の発達と果実形成の過程において, 養分輸送とシグナル伝達に重要な役割を持

つ (Rančić et al., 2010). *SPFF* 遺伝子にコードされる受容体様タンパク質は花器官の正常な発達や受粉後の果実形成に不可欠な因子の輸送に関与している可能性があり、このタンパク質の機能欠損は、雄性不稔を含む花と果実の発達システムの重大な欠陥を誘発する可能性がある。事実、*spff* 変異体は野生株と比較して小さな花が形成されることから、物質輸送が滞った可能性がある (図 3, 図 2-4)。今後、*spff* 変異体の物質輸送の変化に関する詳細な解明により、トマトの果実形成や単為結果のメカニズムに新たな知見がもたらされる可能性がある。例えば、メタボローム解析を行い、野生株の受粉前後の子房における代謝産物のプロファイリングと、*spff* 変異体の未受粉の子房の代謝産物を比較することにより、*SPFF* 遺伝子が制御する果実形成に重要な因子を網羅的に同定することが可能である。また、果実形成に重要な物質の代謝・転流への影響を調べるため、安定同位体の窒素や炭素を追跡子 (トレーサー) として用い、その濃度分布をイメージングする等といった研究の余地がある。さらに、果実発達における受容体様タンパク質の役割についても未解明の部分が多く、*SPFF* タンパク質のキナーゼドメインの標的リガンドも未だ同定されていない。リガンドの同定の手法として、bimolecular fluorescence complementation (BiFC, 二分子蛍光補完) や、Yeast Two Hybrid (Y2H, 酵母 2 ハイブリッドシステム) や、Immunoprecipitation (IP, 免疫沈降) が候補として挙げられ、リガンド同定を含む受容体様タンパク質 *SPFF* の機能解明は、トマトの果実発達における受容体様タンパク質の役割を解明する端緒となる。そして、温度や湿度など外因的な制御でリガンドを含む果実形成の重要因子を操ることができれば、トマト農家は生産時に選択的に単為結果を引き起こすことができる可能性がある。

本研究の第 1 章と第 2 章で得られた成果を統合して、単為結果性を有する  $F_1$  品種の採種を CMS を用いて効率的に行うことが最も望まれるが、現状では以下の 2 つのジレンマがある。まず、(1)  $F_1$  品種では遺伝子型が両親系統由来のヘテロザイガスになるため、*spff* のような潜性遺伝子変異による単為結果を  $F_1$  品種で顕在化させるためには、採種を行う両親系統に *spff* 変異を付与する必要がある。しかし、*spff* 変異は (核遺伝子に由来する) 雄性不稔を伴うため、花粉親が稔性を失ってしまう。仮に (1) の問題を解消し、核遺伝子に由来する雄性不稔を伴わない単為結果や、顕性に遺伝子する単為結果を実現したとしても、(2) 種子親が単為結果性を持ち種無し果を形成しうるのは、採種作業の非効率化に繋がる。そのため、本研究成果も含めたさらなる単為結果メカニズ

ムの解明により、温度などの環境制御で調節可能な単為結果性トマト品種を作出することが求められる。これが実現すれば、種子の生産時には単為結果を引き起こさせず、果実の生産時には単為結果を引き起こすことが、温室の環境制御により可能になる。

さらに、本研究で *Rf* 遺伝子の座乗領域を絞り込んだことは、*Rf* 遺伝子を取って持たせない単為結果性 CMS 品種の作出にも寄与する。CMS と単為結果性を併せ持つ系統では、これまで核雄性不稔では実現できなかった花粉の制御が可能である。まず、固定種の商品化が可能である。これまで、核雄性不稔により花粉稔性を持たない固定種は自殖不可能の為に採種ができず、一方、花粉稔性のある固定種は農家による自家採種が可能である為に商品化されてこなかった。しかし、単為結果性に加えて多くの好ましい形質を持つ固定種を作出して花粉親、その固定種を維持系統として作出した CMS 系統を種子親、とすることで、戻し交雑により、「雄性不稔により農家は自家採種できないが単為結果により果実を形成する固定種」の採種と商品化が可能である。単為結果性を持つ CMS 品種は種子ができないため、トマトジュースやトマトケチャップへの加工過程において種子を取り除く必要のない加工用トマトとして、潜在需要があると考えられる。実際、トマトと同じナス科に属するナスでは、単為結果性品種「あのみり」の CMS 付与による完全種なしナス品種の育成が取り組まれてきた（農畜産業振興機構、参照 2020-11-29）。さらに、*Rf* 遺伝子を持たない単為結果性 CMS 品種の作出は、ミラクリン高蓄積品種など商業利用されている遺伝子組み換えトマトのジーンフロー抑制にも利用できる。具体的には、単為結果性により一定の収量を保ちながらも、何らかの要因で周辺環境に組換え体の花粉が飛散した場合にも CMS によって花粉が稔性を失っているため、自然界に組換え遺伝子が広がるリスクを抑えることができる。

一方、単為結果メカニズムの解明において、CMS 系統を利用することも可能であると考える。核遺伝子にコードされる *MADS BOX* 遺伝子の機能抑制により雄蕊の初期発達異常が引き起こされた例や、雌雄不稔性と雌雄配偶子形成異常が単為結果を引き起こされた例は報告されているのに対し、本研究で用いた「CMS[MSA1]品種 A\_BC7」は雄性不稔性を持つが単為結果性を持たない (Pnueli et al., 1994, Ampomah-Dwamena et al., 2002, Mazzucato et al., 2008, Quinet et al., 2014, Okabe et al., 2019, Hao et al., 2017, Rojas-Gracia et al., 2017)。このことは、花粉稔性の有無は直接的に単為結果とは関連せず、「CMS[MSA1]品種 A\_BC7」に見られない葯発達の異常が単為結果を誘導する可能性を示唆する。

総じて、CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 種子生産が可能になれば、トマトの採種の省力化に繋がる。また、トマトの果実形成メカニズムの解明は、新規の単為結果品種の作出に寄与し、トマトの生産の省力化に資する。今後、単為結果メカニズムの解明を通じて、花粉稔性への影響がなく顕性の単為結果遺伝子を持つ親系統を作出することができれば、単為結果性を持つ F<sub>1</sub> 品種の作出と CMS を用いたその F<sub>1</sub> 採種が実現し、採種と果実生産の両側面において労働負担の軽減を実現した品種の開発に寄与する可能性がある。また、CMS と単為結果性を併せ持つ系統では、固定種の商品化や、遺伝子組換えトマトの花粉を介したジーンフロー防止を実現する可能性を持つ。本研究はそのための基盤技術を整えたと言える。本研究で同定した新規の単為結果遺伝子 *SPFF* の機能解明により、果実形成メカニズムがより深く解明されることで、トマト生産者が単為結果を利用した受粉不要なトマト生産を行えるようになる。さらに、*Rf* 遺伝子の座乗領域の同定は、*Rf* 遺伝子を持つ花粉親育種のための遺伝子マーカーの作出に直接役立てることができ、CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 種子生産における花粉親の課題を解決する。本研究でマルハナバチによる訪花と高い F<sub>1</sub> 採種性の確認された ‘CMS[MSA1]品種 B\_BC3’ に代表されるような、柱頭露出かつハチの訪花する系統を種子親として用いれば、前述の花粉親と合わせて CMS 系統を用いた F<sub>1</sub> 種子生産が可能になる。

# 摘要

## 摘要

近年、トマトの種子生産と果実生産の両側面において、作業の効率化が求められている。本研究では、トマトのF<sub>1</sub>採種時における除雄作業と、果実生産時における受粉作業に着目し、それぞれの作業の省力化に寄与する基盤技術の開発を目的とした。具体的には、第1章では、除雄作業の要らない採種を実現するため、CMSを用いたF<sub>1</sub>採種システムの構築を目指した。第2章では、受粉作業の要らない果実生産を実現するため、単為結果メカニズムの一端を解明することによる新規の着果制御技術の発見を目指した。

一般に作物のF<sub>1</sub>採種を効率化できる細胞質雄性不稔 (cytoplasmic male sterility, CMS) は、核と細胞質の遺伝子産物の不親和により正常な (稔性のある) 花粉が産生されない現象である。トマトにおいては、非対称性細胞融合によるCMS系統 'CMS[MSA1]' が作出されたが、それを利用した採種システムが確立されていない。その原因は、花粉親と種子親にそれぞれ課題が存在するためである。花粉親の抱える課題は、果菜類のCMS系統を用いたF<sub>1</sub>採種において花粉親が持つべき稔性回復 (*Nuclear Restorer of Fertility, Rf*) 遺伝子が同定されていないことである。種子親が抱える課題は、トマトの花の構造上、葯が筒状に柱頭を囲い覆っているために、他殖種子を得る効率が著しく低いことである。第1章では、CMSを用いた除雄不要なF<sub>1</sub>採種システムの構築における、花粉親と種子親の課題解決を目指した。

まず、花粉親の課題解決のため、*Rf* 遺伝子の候補の同定を行った。ロングリードシーケンサーとショートリードシーケンサーを用いて2つの*Rf*系統トマト *S. pimpinellifolium* 'LA1670', *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* 'LA1673' のゲノム配列を取得し、12の擬似染色体を構築した。構築した擬似染色体に対して発現遺伝子の情報を付与するため、複数の器官を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を行い、それぞれの系統で29,629個と29,185個の発現遺伝子を同定した。発現遺伝子のうち、*Rf* 遺伝子の候補を同定するため、*S. pimpinellifolium* 'LA1670' の持つ *Rf* 遺伝子がCMS系統 'CMS[MSA1] 品種 A\_BC7' ('CMS[MSA1]' に対して栽培品種 '品種 A' を維持系統として7回戻し交雑した系統) の花粉稔性を回復させる様式をF<sub>2</sub>集団の分離比より解明した。次いで、F<sub>2</sub> 集団を対象として Double Digest Restriction Site Associated DNA Sequence (ddRAD) シーケンスを用いた *Rf* 遺伝子のラフマッピングを行った。その結果、*Rf* 遺伝子の推定座乗領域を4.7 Mbの領域に絞りこんだ。次に、種子親の課題解決のため、花柱が伸長する遺伝子変異 *style2.1* を持つ 'IL2-5' と、柱頭が露出する形質を持つ '品種 B' を維持系統

とした2系統のCMS系統を作出した。作出した柱頭露出型CMS系統、並びに非柱頭露出型CMS系統、および花粉稔性が正常な系統を同じ温室で栽培し、除雄作業を行わずに、訪花昆虫クロマルハナバチを用いてF<sub>1</sub>採種を行った。結果として、柱頭露出型CMS系統を用いたF<sub>1</sub>採種が可能であることを実証した。また、ハチによる交配の採種効率を人為による交配と比較した。その結果、非柱頭露出型CMS系統ではハチによる交配で採種数が大幅に減少したのに対し、柱頭露出型CMS系統では人為による交配と同程度の採種数が得られる系統が見られた。

第2章では、受粉作業なしでのトマト生産を可能にする、新規の単為結果性遺伝子の同定とその機能解明を行った。単為結果とは、受粉/受精なしで果実を形成する性質である。所属研究室の先行研究により、矮性トマト品種‘Micro-Tom’のガンマー線照射由来変異体集団から、小さい単為結果果実を結実する変異体 *small parthenocarpic fruit and flower (spff)* が単離された。F<sub>2</sub>集団の分離比より、*spff*変異体の表現型は単一の潜性遺伝子であることが推定されており、illumina SNP Infinium 解析により原因遺伝子の座上領域が第4染色体上の2つのSNPマーカーによって挟まれる2.6 Mbの領域に限定されていた。この領域内には267個のタンパク質コード遺伝子が含まれており、全ゲノムシーケンスによるマッピングにより、アミノ酸の変化を伴う77個の候補変異と、それらの座乗する46個の候補遺伝子が特定されていた。しかし、46個の遺伝子のうち、どの遺伝子が*spff*変異体に単為結果をもたらす原因遺伝子なのかは明らかにされていなかった。

本研究ではまず、*spff*変異体の原因遺伝子同定を目的として、連鎖解析による候補遺伝子の絞り込みとRNA干渉(RNA interference, RNAi)法による原因遺伝子の検証を行った。その結果、第4染色体上の*Solyc04g077010*にコードされる受容体様タンパク質の機能欠損が、単為結果を含む*spff*変異体の表現型を引き起こしていることを明らかにした。次に、*SPFF*遺伝子の機能解明のため、*spff*変異体の栄養器官と生殖器官における表現型の詳細な特徴付けや、未受粉の雌蕊を用いたRNAシーケンスによる網羅的な発現遺伝子解析、相同遺伝子の機能欠損体との表現型の比較等を行った。その結果、花托の維管束細胞での発現量が高い受容体様タンパク質の機能欠損が、ジベレリン合成遺伝子の発現促進やジベレリン不活化遺伝子の発現抑制をもたらし、受粉前の子房細胞の肥大ひいては単為結果を誘導する可能性が示唆された。



# 謝辭

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導を頂いた筑波大学 生命環境系 有泉亨准教授に厚く御礼申し上げます。フランス国立農学研究所 (INRA) の Michel Hernould 博士, 同 Christian Chevalier 博士, 東京農工大学 グローバルイノベーション研究院 篠崎良仁助教, 筑波大学 生命環境系 江面浩教授には研究の方針から手法に至るまでご助言を賜りました。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 高度解析センター 矢野亮一博士, かずさ DNA 研究所 白澤健太博士には解析全般において多大なご指導を頂きました。筑波大学 生命環境系 大澤良教授, 農業・食品産業技術総合研究機構 高度解析センター 田中剛氏には, 本博士論文の作成にあたりご閲覧の労を賜りました。また, トキタ種苗株式会社大和根研究農場の松澤佑馬様, 飯岡真司様には栽培や実験の労を賜りました。筑波大学蔬菜花卉学研究室の皆様には研究や議論の機会を頂き, 大変お世話になりました。独立行政法人日本学術振興会より研究奨励金と研究費を交付して頂きました。この場を借りて, 感謝申し上げます。最後に, これまで支えてくれた友人達, 先輩達, 後輩達そして家族に最大の感謝と敬意を表します。

## 引用文献

## 引用文献

- Alonge, M., Wang, X., Benoit, M., Soyk, S., Pereira, L., Zhang, L., Suresh, H., Ramakrishnan, S., Maumus, F., Ciren, D., Levy, Y., Harel, T. H., Shalev-Schlosser, G., Amsellem, Z., Razifard, H., Caicedo, A. L., Tieman, D. M., Klee, H., Kirsche, M., Aganezov, S., ... Lippman, Z. B. (2020). Major impacts of widespread structural variation on gene expression and crop improvement in tomato. *Cell*, *182*(1), 145–161.e23.
- Ampomah-Dwamena, C., Morris, B. A., Sutherland, P., Veit, B., & Yao, J. L. (2002). Down-regulation of TM29, a tomato SEPALLATA homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiology*, *130*(2), 605–617.
- Ariizumi, T., Aoki, K., & Ezura, H. (2011). Systematic development of tomato bioresources in Japan. *Interdisciplinary Bio Central*, *3*(1), 1.1-1.6.
- Bedinger, P. A., Chetelat, R. T., McClure, B., Moyle, L. C., Rose, J. K., Stack, S. M., van der Knaap, E., Baek, Y. S., Lopez-Casado, G., Covey, P. A., Kumar, A., Li, W., Nunez, R., Cruz-Garcia, F., & Royer, S. (2011). Interspecific reproductive barriers in the tomato clade: opportunities to decipher mechanisms of reproductive isolation. *Sexual Plant Reproduction*, *24*(3), 171–187.
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M. J., & Nuez, F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PloS one*, *7*(10), e48198.
- Bohra, A., Jha, U. C., Adhimoolam, P., Bisht, D., & Singh, N. P. (2016). Cytoplasmic male sterility (CMS) in hybrid breeding in field crops. *Plant Cell Reports*, *35*(5), 967–993.
- Bollier, N., Sicard, A., Leblond, J., Latrasse, D., Gonzalez, N., Gévaudant, F., Benhamed, M., Raynaud, C., Lenhard, M., Chevalier, C., Hernould, M., & Delmas, F. (2018). At-MINI ZINC FINGER2 and SI-INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY, a conserved missing link in the

regulation of floral meristem termination in Arabidopsis and tomato. *The Plant Cell*, 30(1), 83–100.

Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Peres, L. E., Atares, A., & Garcia-Martinez, J. L. (2012). Characterization of the procerato tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiology*, 160(3), 1581–1596.

Chen, K. Y., Cong, B., Wing, R., Vrebalov, J., & Tanksley, S. D. (2007). Changes in regulation of a transcription factor lead to autogamy in cultivated tomatoes. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5850), 643–645.

Dahan, J., & Mireau, H. (2013). The Rf and Rf-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA Biology*, 10(9), 1469–1476.

de Martino, G., Pan, I., Emmanuel, E., Levy, A., & Irish, V. F. (2006). Functional analyses of two tomato *APETALA3* genes demonstrate diversification in their roles in regulating floral development. *The Plant Cell*, 18(8), 1833–1845.

Dempsey, W. H. (1965). Effect of seed number on tomato fruit size and maturity. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 86, 575–581.

Dinar, M., & Rudich, J. (1985). Effect of heat stress on assimilate partitioning in tomato. *Annals of Botany*, 56(2), 239–248.

Domínguez, M., Dugas, E., Benchouaia, M., Leduque, B., Jiménez-Gómez, J. M., Colot, V., & Quadrana, L. (2020). The impact of transposable elements on tomato diversity. *Nature Communications*, 11(1), 1–11.

Driedonks, N. J. W. (2018). From flower to fruit in the heat - Reproductive thermotolerance in tomato and its wild relatives, (Doctoral dissertation, Radboud University, Nijmegen, Netherlands), Retrieved from the academic publication repository in Collections Radboud University (<https://hdl.handle.net/2066/187212>), 1-190

Egashira, H., Ishihara, H., Takashina, T., & Imanishi, S. (2000). Genetic diversity of the 'peruvianum-complex' (*Lycopersicon peruvianum* (L.) Mill. and *L. chilense* Dun.) revealed by RAPD analysis. *Euphytica*, *116*(1), 23-31.

Erickson Jr, E. H. (1983). Pollination of entomophilous hybrid seed parents. *Handbook of experimental pollination biology*, JONES, C. E. and R. J. LITTLE (eds.), Scientific and Academic Editions. New York, Cincinnati, Toronto, London and Melbourne. 493-535.

Eshed, Y., & Zamir, D. (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics*, *141*(3), 1147-1162.

Feng, S., Cokus, S. J., Schubert, V., Zhai, J., Pellegrini, M., & Jacobsen, S. E. (2014). Genome-wide Hi-C analyses in wild-type and mutants reveal high-resolution chromatin interactions in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, *55*(5), 694-707.

Fernie, A. R., & Aharoni, A. (2019). Pan-genomic illumination of tomato identifies novel gene-trait interactions. *Trends in Plant Science*, *24*(10), 882-884.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, "Crops", FAOSTAT, 2020-09-14, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (2020-09-17)

Gaffney, A., Bohman, B., Quarrell, S. R., Brown, P. H., & Allen, G. R. (2019). Limited cross plant movement and non-crop preferences reduce the efficiency of honey bees as pollinators of hybrid carrot seed crops. *Insects*, *10*(2), 34.

Gao, L., Gonda, I., Sun, H., Ma, Q., Bao, K., Tieman, D. M., Burzynski-Chang, E. A., Fish, T. L., Stromberg, K. A., Sacks, G. L., Thannhauser, T. W., Foolad, M. R., Diez, M. J., Blanca, J., Canizares, J., Xu, Y., van der Knaap, E., Huang, S., Klee, H. J., Giovannoni, J. J., ... Fei, Z. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*, *51*(6), 1044–1051.

García-Hurtado, N., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., López-Gresa, M. P., Hedden, P., Gong, F., & García-Martínez, J. L. (2012). The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, *63*(16), 5803-5813.

Georgiev, H. (1991). Heterosis in tomato breeding. In *Genetic Improvement of Tomato* (pp. 83-98). Springer, Berlin, Heidelberg.

Goff, S. A. and Klee, H. J. 2006, Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value?. *Science*, *311*(5762), 815-819.

Gorguet, B., Van Heusden, A. W., & Lindhout, P. (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biology*, *7*(2), 131-139.

Groot, S. P., Bruinsma, J., & Karssen, C. M. (1987). The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin - deficient mutant. *Physiologia Plantarum*, *71*(2), 184-190.

Hao, S., Ariizumi, T., & Ezura, H. (2017). *SEXUAL STERILITY* is essential for both male and female gametogenesis in tomato. *Plant and Cell Physiology*, *58*(1), 22-34.

Hassan, A. I. A. 2010, Mean performance, heterosis and combining abilities of tomato crosses under saline conditions. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 1(2), 81-92.

Havey, M. J. (2004). The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* (pp. 623-634). Springer, Dordrecht.

Hosmani, P. S., Flores-Gonzalez, M., van de Geest, H., Maumus, F., Bakker, L. V., Schijlen, E., van Haarst, J., Cordewener, J., Sanchez-Perez, G., Peters, S., Fei, Z. Giovannoni, J. J., Mueller, L. A., Saha, S. (2019). An improved de novo assembly and annotation of the tomato reference genome using single-molecule sequencing, Hi-C proximity ligation and optical maps. *bioRxiv*, 767764. <https://doi.org/10.1101/767764>

IndexBox, “Global tomato market 2019 – Robust consumption growth in China and India drives the global market”, Global Trade, 2019-08-19, <https://www.globaltrademag.com/global-tomato-market-2019-robust-consumption-growth-in-china-and-india-drives-the-global-market/> (2020-09-17)

Jasinski, S., Tattersall, A., Piazza, P., Hay, A., Martinez-Garcia, J. F., Schmitz, G., Therès, K., McCormick, S., & Tsiantis, M. (2008). *PROCERA* encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 56(4), 603–612.

Johansen, K., Morton, M., Malbeteau, Y. M., Aragon, B., Al-Mashharawi, S. K., Ziliani, M. G., Angel, Y., Fiene, G. M., Negrão, S., Mousa, M., Tester, M. A., & McCabe, M. F. (2019). Unmanned aerial vehicle-based phenotyping using morphometric and spectral analysis can quantify responses of wild tomato plants to salinity stress. *Frontiers in plant science*, 10, 370.

Kobayashi, K., Horisaki, A., Niikura, S., & Ohsawa, R. (2006). Inter-accession variation in floral morphology in radish (*Raphanus sativus* L.). *Euphytica*, 152(1), 87-97.



- Li, J., Wu, Z., Cui, L., Zhang, T., Guo, Q., Xu, J., Jia, L., Lou, Q., Huang, S., Li, Z., & Chen, J. (2014). Transcriptome comparison of global distinctive features between pollination and parthenocarpic fruit set reveals transcriptional phytohormone cross-talk in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant & Cell Physiology*, *55*(7), 1325–1342.
- Lin, Y. P., Liu, C. Y., & Chen, K. Y. (2019). Assessment of genetic differentiation and linkage disequilibrium in *Solanum pimpinellifolium* using genome-wide high-density SNP markers. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *9*(5), 1497-1505.
- Liu, D., Yang, L., Zhang, J. Z., Zhu, G. T., Lu, H. J., Lu, Y. Q., Wang, Y. L., Cao, X., Sun, T. S., Huang, S. W., & Wu, Y. Y. (2020). Domestication and breeding changed tomato fruits transcriptome. *Journal of Integrative Agriculture*, Volume 19, Issue 1, 120–132.
- Livne, S., Lor, V. S., Nir, I., Eliaz, N., Aharoni, A., Olszewski, N. E., Eshed, Y., & Weiss, D. (2015). Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato *procera* mutants. *The Plant Cell*, *27*(6), 1579–1594.
- Martí, C., Orzáez, D., Ellul, P., Moreno, V., Carbonell, J., & Granell, A. (2007). Silencing of DELLA induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. *The Plant Journal*, *52*(5), 865-876.
- Martínez-Bello, L., Moritz, T., & López-Díaz, I. (2015). Silencing C19-GA 2-oxidases induces parthenocarpic development and inhibits lateral branching in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, *66*(19), 5897-5910.
- Mata-Nicolás, E., Montero-Pau, J., Gimeno-Paez, E., Garcia-Carpintero, V., Ziarsolo, P., Menda, N., Mueller, L. A., Blanca, J., Cañizares, J., van der Knaap, E., & Díez, M. J. (2020). Exploiting the diversity of tomato: the development of a phenotypically and genetically detailed germplasm collection. *Horticulture Research*, *7*, 66.
- Matsukura, C., Yamaguchi, I., Inamura, M., Ban, Y., Kobayashi, Y., Yin, Y. G., Saito, T., Kuwata,

C., Imanishi, S., & Nishimura, S. (2007). Generation of gamma irradiation-induced mutant lines of the miniature tomato (*Solanum lycopersicum* L.) cultivar 'Micro-Tom'. *Plant Biotechnology*, 24(1), 39-44.

Mazzucato, A., Olimpieri, I., Siligato, F., Picarella, M. E., & Soressi, G. P. (2008). Characterization of genes controlling stamen identity and development in a parthenocarpic tomato mutant indicates a role for the DEFICIENS ortholog in the control of fruit set. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 526-537.

Medina, M., Roque, E., Pineda, B., Cañas, L., Rodríguez - Concepción, M., Beltrán, J. P., & Gómez - Mena, C. (2013). Early anther ablation triggers parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 11(6), 770-779.

Melchers, G., Mohri, Y., Watanabe, K., Wakabayashi, S., & Harada, K. (1992). One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(15), 6832-6836.

Moyle L. C. (2008). Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution; international journal of organic evolution*, 62(12), 2995–3013.

Mubarok, S., Hoshikawa, K., Okabe, Y., Yano, R., Tri, M. D., Ariizumi, T., & Ezura, H. (2019). Evidence of the functional role of the ethylene receptor genes *SlETR4* and *SlETR5* in ethylene signal transduction in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 294(2), 301-313.

Okabe, Y., Yamaoka, T., Ariizumi, T., Ushijima, K., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Kusano, M., Shinozaki, Y., Pulungan, S. I., Kubo, Y., Nakano, R., & Ezura, H. (2019). Aberrant stamen development is associated with parthenocarpic fruit set through up-regulation of gibberellin biosynthesis in tomato. *Plant & Cell Physiology*, 60(1), 38–51.

Olimpieri, I., Siligato, F., Caccia, R., Soressi, G. P., Mazzucato, A., Mariotti, L., & Ceccarelli, N. (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta*, *226*(4), 877-888.

Ozores-Hampton, M. (2014). Hand pollination of tomato for breeding and seed production. *Univ. Florida Inst. Food Agric. Sci.*

Passam, H. C., Karapanos, I. C., Bebeli, P. J., & Savvas, D. (2007). A review of recent research on tomato nutrition, breeding and post-harvest technology with reference to fruit quality. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, *1*(1), 1-21.

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, *405*(6783), 200-203.

Pnueli, L., Hareven, D., Broday, L., Hurwitz, C., & Lifschitz, E. (1994). The TM5 MADS box gene mediates organ differentiation in the three inner whorls of tomato flowers. *The Plant Cell*, *6*(2), 175-186.

Quinet, M., Bataille, G., Dobrev, P. I., Capel, C., Gómez, P., Capel, J., Lutts, S., Motyka, V., Angosto, T., & Lozano, R. (2014). Transcriptional and hormonal regulation of petal and stamen development by *STAMENLESS*, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) orthologue to the B-class *APETALA3* gene. *Journal of Experimental Botany*, *65*(9), 2243-2256.

Ramani, V., Deng, X., Qiu, R., Gunderson, K. L., Steemers, F. J., Disteche, C. M., Noble, W. S., Duan, Z., & Shendure, J. (2017). Massively multiplex single-cell Hi-C. *Nature Methods*, *14*(3), 263-266.

Rančić, D., Quarrie, S. P., & Pećinar, I. (2010). Anatomy of tomato fruit and fruit pedicel during fruit development. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, *2*, 851-861.

Razali, R., Bougouffa, S., Morton, M., Lightfoot, D. J., Alam, I., Essack, M., Arold, S. T., Kamau, A. A., Schmöckel, S. M., Pailles, Y., Shahid, M., Michell, C. T., Al-Babili, S., Ho, Y. S., Tester, M., Bajic, V. B., & Negrão, S. (2018). The genome sequence of the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* provides insights into salinity tolerance. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1402.

Razifard, H., Ramos, A., Della Valle, A. L., Bodary, C., Goetz, E., Manser, E. J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., van der Knaap, E., & Caicedo, A. L. (2020). Genomic evidence for complex domestication history of the cultivated tomato in Latin America. *Molecular Biology and Evolution*, *37*(4), 1118–1132.

Rojas-Gracia, P., Roque, E., Medina, M., Rochina, M., Hamza, R., Angarita-Díaz, M.P., Moreno, V., Pérez-Martín, F., Lozano, R., Cañas, L., Beltrán, J. P., & Gómez-Mena, C. (2017). The parthenocarpic *hydra* mutant reveals a new function for a *SPOROCTELESS*-like gene in the control of fruit set in tomato. *New Phytologist*, *214*: 1198-1212.

Ruiu, F., Picarella, M. E., Imanishi, S., & Mazzucato, A. (2015). A transcriptomic approach to identify regulatory genes involved in fruit set of wild-type and parthenocarpic tomato genotypes. *Plant Molecular Biology*, *89*(3), 263-278.

Safaei, M., Olfati, J. A., Hamidoghli, Y., Rabiei, B., Yamamoto, E., & Shirasawa, K. 2020. Four genetic loci control compact plant size with yellow pear - shaped fruit in ornamental tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The Plant Genome*, e20017.

Saito, T., Ariizumi, T., Okabe, Y., Asamizu, E., Hiwasa-Tanase, K., Fukuda, N., Mizoguchi, T., Yamazaki, Y., Aoki, K., & Ezura, H. (2011). TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant & Cell Physiology*, *52*(2), 283–296.

Salehi, B., Sharifi-Rad, R., Sharopov, F., Namiesnik, J., Roointan, A., Kamle, M., Kumar, P., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2019). Beneficial effects and potential risks of tomato consumption for human health: An overview. *Nutrition*, *62*, 201-208.

Serrani, J. C., Fos, M., Atarés, A., & García-Martínez, J. L. (2007). Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv 'Micro-Tom' of tomato. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 211-221.

Serrani, J. C., Sanjuan, R., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., & Garcia-Martinez, J. L. (2007). Gibberellin regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiology*, 145, 246-257.

Serrani, J. C., Ruiz-Rivero, O., Fos, M., & García-Martínez, J. L. (2008). Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal*, 56, 922-934.

Shinozaki, Y., Hao, S., Kojima, M., Sakakibara, H., Ozeki-Iida, Y., Zheng, Y., Fei, Z., Zhong, S., Giovannoni, J. J., Rose, J. K., Okabe, Y., Heta, Y., Ezura, H., & Ariizumi, T. (2015). Ethylene suppresses tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit set through modification of gibberellin metabolism. *The Plant Journal : for cell and molecular biology*, 83(2), 237-251.

Sim, S. C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganai, M. W., Van Deynze, A., Hamilton, J. P., Buell, C. R., Causse, M., Wijeratne, S., & Francis, D. M. (2012). Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PloS one*, 7(7), e40563.

Stuber, C. W. (1994). Heterosis in plant breeding. *Plant Breeding Reviews*, 12, 227-251.

Takei, H., Shinozaki, Y., Yano, R., Kashojiya, S., Hernould, M., Chevalier, C., Ezura, H., & Ariizumi, T. (2019). Loss-of-function of a tomato receptor-like kinase impairs male fertility and induces parthenocarpic fruit set. *Frontiers in Plant Science*, 10, 403.

Takei, H., Shirasawa, K., Kuwabara, K., Toyoda, A., Matsuzawa, Y., Iioka, S., & Ariizumi, T. (2021). *De novo* genome assembly of two tomato ancestors, *Solanum pimpinellifolium* and *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, by long-read sequencing. *DNA Research*, Advance online publication, <https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa029>

Tang, N., Deng, W., Hu, G., Hu, N., & Li, Z. (2015). Transcriptome profiling reveals the regulatory mechanism underlying pollination dependent and parthenocarpic fruit set mainly mediated by auxin and gibberellin. *PLoS One*, *10*(4), e0125355.

Teasdale, J. R., & Abdul-Baki, A. A. (1995). Soil temperature and tomato growth associated with black polyethylene and hairy vetch mulches. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *120*(5), 848-853.

The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* *485*, 635–641.

Vivian-Smith, A., Luo, M., Chaudhury, A., & Koltunow, A. (2001). Fruit development is actively restricted in the absence of fertilization in *Arabidopsis*. *Development*, *128*(12), 2321-2331.

Vriezen, W. H., Feron, R., Maretto, F., Keijman, J., & Mariani, C. (2008). Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytologist*, *177*(1), 60-76.

Wang, H., Schauer, N., Usadel, B., Frasse, P., Zouine, M., Hernould, M., Latché, A., Pech, J. C., Fernie, A. R., & Bouzayen, M. (2009). Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *The Plant Cell*, *21*(5), 1428–1452.

Wang, X., Gao, L., Jiao, C., Stravoravdis, S., Hosmani, P. S., Saha, S., Zhang, J., Mainiero, S., Strickler, S. R., Catala, C., Martin, G. B., Mueller, L. A., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Wu, S., & Fei, Z. (2020). Genome of *Solanum pimpinellifolium* provides insights into structural variants during tomato breeding. *Nature Communications*, *11*(1), 5817.

Yan, Z., Pérez-de-Castro, A., Díez, M. J., Hutton, S. F., Visser, R., Wolters, A. A., Bai, Y., & Li, J. (2018). Resistance to tomato yellow leaf curl virus in tomato germplasm. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1198.

Zhang, S., Xu, M., Qiu, Z., Wang, K., Du, Y., Gu, L., & Cui, X. (2016). Spatiotemporal transcriptome provides insights into early fruit development of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.

Zuriaga, E., Blanca, J. M., Cordero, L., Sifres, A., Blas-Cerdán, W. G., Morales, R., & Nuez, F. 2009, Genetic and bioclimatic variation in *Solanum pimpinellifolium*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56(1), 39.

浅田真一, 北宜裕, 2001, 農業技術から見たポリネーションの応用研究 施設トマトでのマルハナバチの利用, 日本花粉学会会誌, 47 (1), 63-73

大川浩司, 2012, 単為結果性トマトの着果および果実肥大ならびに種子形成に関する研究, 博士論文, 大阪府立大学, 1-106

株式会社ニチレイ, 渡部 一夫, 原田 和彦, 近藤 浩一, 1995, 稔性を回復させた F 1 トマト植物の作出方法, 特開平 9-28223, 2003-1-10 (特許第 3386292 号)

小出哲哉, 2007, トマトの受粉に役立つマルハナバチ, 豊田市矢作川研究所 月報, 2007.2 No. 104

篠原温, 2014, 農学基礎シリーズ 野菜園芸学の基礎, 農山漁村文化協会, p 48-81

武井瞳, 江面健太郎, 江面浩, & 有泉亨, 2017, トマトの生産安定化に寄与する単為結果の作用機序. 育種学研究, 19(4), 137-144.

農林水産省, 2007, 「農業経営統計調査 / 野菜・果樹品目別統計 長期累年 野菜・果樹品目別統計」, 農業経営統計調査, 2007-12-30, [https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen\\_type/h\\_sehi\\_kizyun/pdf/ibasiza15.pdf](https://www.maff.go.jp/j/seisan/kankyo/hozen_type/h_sehi_kizyun/pdf/ibasiza15.pdf) (参照 2020-09-17)

農林水産省, 2019, 「作物統計調査 / 作況調査 (野菜) 確報 平成 30 年産野菜生産出荷統計」, 作物統計, 2019-12-09, <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/index.html> (参照 2020-09-17)

農林水産省, 2020, 「品種登録データ検索」, 品種登録ホームページ, 2020-09-16, <http://www.hinshu2.maff.go.jp> (参照 2020-09-17)

農林水産先端技術産業振興センター, 2009, 「海外及び国内野菜採種現地調査報告書」, 2009-11, <https://www.jataff.jp/project/download/pdf/30-2010033010270310556.pdf>, (参照 2020-09-30)

服部正平, 2014, NGS アプリケーション今すぐ始める! メタゲノム解析実験プロトコール〜ヒト常在細菌叢から環境メタゲノムまでサンプル調製と解析のコツ, 実験医学別冊, 羊土社

浜崎章洋, 中野幹久, 2015, 種子のサプライチェーン: タキイ種苗の事例に学ぶリスク管理, 京都マネジメント・レビュー, (27) p 43-62

水野宗衛, 2008, ミツバチを利用した熱帯果樹の受粉効果, 熱帯農業研究, 1 (2) p 73-77