

トマトの果実発達を制御する新規分子メカニズムの解明

2017 年 1 月

羽尾周平

トマトの果実発達を制御する新規分子メカニズムの解明

筑波大学
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

羽尾周平

目次

目次	・ ・ ・ i
略語表	・ ・ ・ iv
序論	・ ・ ・ 1
第 1 章 <i>fasciated carpel 2 (fcc2)</i> 変異体の解析	・ ・ ・ 13
1.1 緒言	・ ・ ・ 14
1.2 材料および方法	・ ・ ・ 15
1.2.1 供試植物および栽培方法	
1.2.2 トマトゲノム DNA の抽出	
1.2.3 形質転換用コンストラクトの構築	
1.2.4 アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換	
1.2.5 フローサイトメーターを用いた倍数性の確認	
1.2.6 導入遺伝子の確認とそのコピー数の調査	
1.2.7 形質転換体 T1 世代におけるホモザイガス, ヘテロザイガス, アザイガスの選 抜	
1.2.8 パラフィン切片の作成と光学顕微鏡を用いた観察	
1.2.9 GUS 染色	
1.2.10 qRT-PCR による遺伝子発現解析	
1.2.11 データベースを用いた <i>FCC2</i> の解析	
1.3 結果・考察 (概要)	・ ・ ・ 31
1.4 図表	・ ・ ・ 33
第 2 章 <i>sexual sterility (ses)</i> 変異体の解析	・ ・ ・ 69
2.1 緒言	・ ・ ・ 70
2.2 材料および方法	・ ・ ・ 71
2.2.1 供試植物および栽培方法	
2.2.2 トマトゲノム DNA の抽出	
2.2.3 形質転換用コンストラクトの構築	

2.2.4	アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換	
2.2.5	フローサイトメーターを用いた倍数性の確認	
2.2.6	導入遺伝子の確認とそのコピー数の調査	
2.2.7	形質転換体 T1 世代におけるホモザイガス, ヘテロザイガス, アザイガスの選抜	
2.2.8	<i>ses</i> および <i>ses2</i> 変異体識別 DNA マーカーによる変異体の選抜	
2.2.9	アレリズムテスト	
2.2.10	パラフィン切片の作成と光学顕微鏡を用いた観察	
2.2.11	GUS 染色	
2.2.12	qRT-PCR による遺伝子発現解析	
2.2.13	データベースを用いた <i>SES</i> および関連遺伝子の解析	
2.3	結果	・ ・ ・ 78
2.3.1	公共データバンクを利用した <i>SES</i> 遺伝子の解析	
2.3.2	<i>ses</i> 変異体の形態学的解析	
2.3.3	<i>ses2</i> 変異体 (e0417) の解析	
2.3.4	遺伝子発現抑制体の解析	
2.3.5	遺伝子全長導入組換え体の解析	
2.3.6	遺伝子過剰発現体の解析	
2.3.7	GUS 染色	
2.3.8	qRT-PCR	
2.3.9	EAR モチーフ接続組換え体の解析	
2.4	考察	・ ・ ・ 88
2.5	図表	・ ・ ・ 95
	総合考察	・ ・ ・ 134
	摘要	・ ・ ・ 141
	謝辞	・ ・ ・ 143
	引用文献	・ ・ ・ 144

略語表

3'UTR :	3'-Untranslated Region, 3'-非翻訳領域
5'UTR :	5'-Untranslated Region, 5'-非翻訳領域
a.a. :	amino acids
AC :	Ailsa Craig
bp :	base pair
CAPS :	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cDNA :	complementary DNA
CDS :	Coding Sequence
dCAPS :	derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
DBA :	Day Before Anthesis, 開花 1 日前
DNA :	Deoxyribonucleic Acid
DW :	Distilled Water
EAR モチーフ :	ERF-associated amphiphilic repression モチーフ
EMS :	Ethyl Methane Sulfonate
F ₁ (F ₂) :	Filial 1 (2)
FAA :	Formalin Acetic acid Alcohol
<i>fcc</i> :	<i>fasciated carpel</i> mutant
MT :	Micro-Tom
MutMap :	Mutation Mapping
NBRP :	National BioResource Project
NMD :	Nonsense-Mediated mRNA Decay, ナンセンスコドン依存的 mRNA 分解
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RNA :	RiboNucleic Acid
RNAi :	RNA interference, RNA 干渉
RPKM :	Reads Per Kilo base of exon Model per million mapped reads
RT-PCR :	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SE :	Standard Error, 標準誤差
<i>ses</i> :	<i>sexual sterility</i> mutant
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism
TAE :	Tris-Acetate-EDTA buffer
TE :	Tris-EDTA buffer
TILLING :	Targeting Induced Local Lesions In Genomes

序論

<研究材料としてのトマト>

植物の基礎研究のモデル植物として、双子葉類ではシロイヌナズナ、単子葉類ではイネがよく用いられている。特にシロイヌナズナはゲノムサイズが小さいことや生育期間が2カ月と短いこと、さらに形質転換体作成が簡便（フローラルディップ法、カルス形成を介さない形質転換体作成法）であることなどの理由から数多くの研究報告がなされている（Clough and Bent, 1998）。しかし、モデル植物であるシロイヌナズナは乾燥した果実（長角果）を形成するが、新鮮な食物としての果実（液果）を形成しないため、果実形成や果実の研究材料としては適切ではない。そこで、新鮮な果実を形成する植物としてトマトが注目されている。トマトはナス科に属する野菜の一つであり、果実の色や形、大きさの異なる多くの品種が存在する（Tanksley, 2004; Paran and van der Knaap, 2007）。また、トマトは世界で最も生産、消費されている果菜類であり、経済的にも重要な野菜の一つである（Bergougnoux, 2014）。そして、トマトのゲノムサイズは他のナス科植物と比較して小さい（約900-950 Mb）ことから（Arumuganathan and Earle, 1991; The Tomato Genome Consortium, 2012）、近年トマトを材料に用いた研究が盛んに行われている。さらに、2011年にトマト‘Heinz 1706’の全ゲノム解読が終了し、タンパク質をコードしている約35,000個の遺伝子のゲノム上における位置や構造が明らかになった（The Tomato Genome Consortium, 2012）。この研究結果はウェブ上で公開されており、トマトを用いた研究がより一層加速していくことが期待される。このように近年ではウェブ上で公開されているデータベースが充実してきており、モデル生物であるシロイヌナズナ、イネ、トマトはもちろん、モデル植物以外でも遺伝子の配列情報に限らず、遺伝子の発現情報なども入手、利用可能となっている（The Bio-Analytic Resource for Plant Biology: <http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>）。

2002年より国内で、ライフサイエンス研究の基礎・基盤となるバイオリソース（動物、植物、微生物等）について収集・保存・提供を行うことを目的としたナショナルバイオリソースプロジェクト（National BioResource Project, NBRP: <http://www.nbrp.jp/>）が始動している。そして、その中のバイオリソースの一つとしてトマトが選ばれ、2007年から筑波大学が中核機関となり、トマトのバイオリソースの整備を行っている。筑波大学では矮性トマト品種 Micro-Tom（図 I）を用いて、エチルメタンスルフォネート（ethylmethane sulfonate, EMS）処理およびガンマ（ γ ）線照射による変異体の作出（Saito et al., 2011; Shikata et al., 2016）とその種子の増殖・保存・配布を行っている。

(TOMATOMA: <http://tomatoma.nbrp.jp/>). また、豊富な変異体集団を用いて、TILLING (Targeting Induced Local Lesions In Genomes) を利用した逆遺伝学による変異体の選抜も行われている (Okabe et al., 2011; Okabe et al., 2013). 多くの遺伝子情報が利用可能な現在、TILLING 技術を用いた変異体の選抜や解析は基礎研究から育種まで、幅広い面で注目されている (Till et al., 2004; Serrat et al., 2014). また、ここで用いられているトマト ‘Micro-Tom’ は草丈が 10-20 cm と小さく、蛍光灯下で多数の個体 (1,325 個体/m²) を栽培できる. さらに播種から結実までが約 70-90 日と短く遺伝学的解析にも適した実験材料であり (Scott and Harbaugh, 1989; Saito et al., 2011), 形質転換も容易である (Sun et al., 2006). そして、他の栽培品種との交配も可能であるため、選抜された優良な変異を交雑育種に用いることもできる (Mubarak et al., 2015; Mubarak et al., 2016).

< トマト果実の研究 >

トマトの起源は南アメリカであるとされており、トマトの原種は果実が小さく食用ではない (Bergougnoux, 2014). トマトに限らず、現在我々が食べている作物は長い年月をかけて人々の手により栽培、育種されてきたものである (Diamond, 2002). 例えば現在の栽培種トマトには、野生種のトマトの果実と比較して 1000 倍近い重い果実を形成する品種が存在する (Lippman and Tanksley, 2001). これはこれまでの研究や育種により、可食部である果実の肥大性を高めた成果である (Tanksley, 2004). このようにトマトはその果実を結実するという特徴から、果実発達や果実特性に直目した研究や育種が盛んに行われている.

トマトの果実発達は大きく 4 つのステージに分けることができる [ステージ 1, 雌蕊形成期; ステージ 2, 細胞分裂期; ステージ 3, 細胞肥大期; ステージ 4, 成熟期] (Ariizumi et al., 2013). 数ある果菜類の中でも、トマト果実は赤熟するという特徴を持っていることから、果実成熟に関する研究が多く行われている. トマト果実の成熟 (赤熟) には植物ホルモンのエチレンが強く関与しており、エチレンの生合成系や感受性に関する研究が多くみられる (Van de Poel et al., 2012; Liu et al., 2015). そして、*RIPENING-INHIBITOR (RIN)*, *NEVER-RIPE (NR)*, *NON-RIPENING (NOR)* などトマトの赤熟を制御している重要な遺伝子がいくつか単離されている (Lincoln and Fischer, 1988; Giovannoni et al., 1995; Wilkinson et al., 1995; Giovannoni, 2004). また、成熟との関連でトマト果実の日持ち性に関する研究も多く行われており、日持ち性を向上させる遺伝子

がいくつか単離されている。エチレン生合成に關与する 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase (ACS) 遺伝子の発現抑制は生体内でエチレンの生合成を抑制し、トマト果実の日持ち性を向上させる (Gupta et al., 2013; Sobolev et al., 2014). また、ペクチンの脱重合に働く酵素遺伝子 polygalacturonase (PG) の発現抑制体もトマト果実収穫後の日持ち性が向上し、さらに裂果を抑制すると報告されている (Schuch et al., 1991; Kramer et al., 1992).

そして、トマト果実を大きくするという目的から、トマト果実の大きさを決定する要因の一つである細胞数および細胞の大きさを制御する果実肥大期 (細胞分裂期, 細胞肥大期) に関する研究も盛んに行われている (Azzi et al., 2015). 現在までに、トマト果実の大きさを制御しているとされる 28 個の量的形質座位 (Quantitative Trait Locus, QTL) が報告されている (Grandillo et al., 1999). その中で最も果実肥大性への影響が大きいとされているのが *FRUIT WEIGHT 2.2 (FW2.2)* であり、この遺伝子の欠損株 (*fw2.2*) は野生株と比べ 30%果実重が増加する (Alpert et al., 1995; Frary et al., 2000). *FW2.2* は細胞分裂を負に制御しており、この遺伝子発現が低下もしくは機能欠損することで果肉の細胞数が増加し、果実が大きくなる (Cong et al., 2002; Liu et al., 2003). また、*SIKLUH/FW3.2* も果実肥大性において重要な遺伝子である。*SIKLUH/FW3.2* は細胞数を正に制御しており、この遺伝子の発現抑制体は果実重が 70%以上減少し、種子の小ささも小さくなると報告されている (Chakrabarti et al., 2013). 一方、細胞肥大は核内倍加 (核相) と関連しており、果実の核相を制御し、細胞肥大に影響を与える遺伝子として *SICCS52A* や *SIKRPI* が知られている (Fernandez et al., 2009; Mathieu-Rivet et al., 2010). さらに、細胞分裂と細胞肥大には、植物ホルモンのオーキシシンとジベレリンがそれぞれ強く関係していることが知られている (de Jong et al., 2009a; Ariizumi et al., 2013). また、オーキシシンとジベレリンは果実の単為結果を誘導する植物ホルモンとしても知られているため、果実肥大と単為結果性は合わせて研究される傾向にある。単為結果を引き起こす植物ホルモン関連の遺伝子として *Indole-3-Acetic Acid 9 (IAA9)* や *Auxin Response Factor 7 (ARF7)*, *DELLA* などが知られている。*IAA9* は *Aux/IAA* 転写因子ファミリーの一つで、オーキシシンの反応を負に制御している遺伝子である。*IAA9* のアンチセンス個体はオーキシシンの反応がオーキシシン非存在下でも恒常的に起きるため単為結果が起きると報告されている。その単為結果率は約 80%にもなり、単為結果性のほかに複葉が単葉になる表現型を示す (Wang et al., 2005; 2009). また、*ARF7* はオーキシシンによって応答する

転写因子であり、この遺伝子の発現抑制組換え体は単為結果性を持つと報告されている (de Jong et al., 2009b). 一方, DELLA はジベレリンのシグナル伝達を負に制御しているタンパク質であり、このタンパク質の機能を欠損させることにより単為結果性が付与される (Martí et al., 2007).

また、果実形態は果実肥大性と共に果実評価の上で重要な要因の一つであり、トマトにおいて果実形態を制御している遺伝子がいくつか単離されている (van der Knaap et al., 2014). 果実形態の変異は大きく 2 つに分けることができる. 細胞の分裂や肥大の差異によるものと細胞分裂や肥大に差のないものである. 前者の例として *SUN* や *OVATE* が挙げられる. *SUN* は第 1 染色体から第 12 染色体まですべての染色体上に 33 個のホモログが存在し (Huang et al., 2013), この遺伝子が高発現することで果実縦方向に細胞分裂が盛んになり、さらに横方向の細胞分裂が減少することで縦長の果実を形成する (Wu et al., 2011). 一方, *OVATE* は第 2 染色体に座乗している遺伝子であり、開花前のつぼみから果実肥大期にかけて発現している. そして、この遺伝子の機能欠損株は一塩基置換によりナンセンス変異が生じており、その結果、洋ナシ状の果実を形成する (Liu et al., 2002). 一方、後者の細胞分裂や肥大に変化のないものは、心皮数の増加による子室数および子室構造の変化である. 子室が増加すると果実横径が増加し、果実の肥大性も増加する (Lippman and Tanksley, 2001). このように子室数が増加する変異体として *fasciated (fas)* や *locule number (lc)* などが知られている. *fas* は第 11 染色体上にて遺伝子 *CLAVATA3 (CLV3)* のプロモーター領域内の逆位により、*CLV3* の発現量が減少したことに起因している (Xu et al., 2015). また、*lc* の原因遺伝子は第 2 染色体上の *WUSCHL (WUS)* 付近に存在することが分かっているが、詳しい分子メカニズムは未だ不明である (Muños et al., 2011). この他にも、心皮の形成枚数が増加する変異体に *fasciated and branched (fab)* や *fasciated inflorescence (fin)*, *excessive number of floral organs (eno)* などが見つかっており、*fab* や *fin* はその原因遺伝子も同定されている (Xu et al., 2015; Fernández-Lozano et al., 2015). *FAB* は *CLV1* をコードしており、*CLV3* や *CLE* ペプチドの受容体として働く. 一方、*FIN* は hydroxyproline O-arabinosyltransferase 3 (*HPAT3*) をコードしており、*CLV3* や *CLE* ペプチドをアラビノシル化させる働きをもつ (Xu et al., 2015).

<雌蕊および花器官の形態>

先述したように、果実の大きさや形態を決定する要因として、開花後の果実肥大のみ

でなく、花器官の形態も重要である。花器官は外側からがく、花弁、雄蕊 (葯), 雌蕊 (心皮) から構成されておりこれらは花芽形成の ABC モデルによって制御されている (Coen and Meyerowitz, 1991). ABC モデルとは、がく (whorl 1) は A クラス遺伝子から、花弁 (whorl 2) は A クラスと B クラス遺伝子から、雄蕊 (whorl 3) は B クラスと C クラス遺伝子から、雌蕊 (whorl 4) は C クラス遺伝子から形成されるという花器官形成のモデルである。また、A, B, C クラスの他にも、胚珠の発達に特異的に働く D クラス遺伝子、A, B, C クラス遺伝子と複合体を形成し、補助的役割を持つ E クラス遺伝子が存在する。そして、これら ABC クラスの遺伝子の多くは MADS-box ファミリーに属しており、各 whorl で複合体を形成し、各花器官の形成に必要な遺伝子の転写因子として働くことが明らかになっている (Robles and Pelaz, 2005; Leseberg et al., 2008; Becker and Ehlers, 2016). シロイヌナズナにおいては、A クラス遺伝子として *APETALA1 (API)* と *AP2*, B クラス遺伝子として *AP3* と *PISTILLATA (PI)*, C クラス遺伝子として *AGAMOUS (AG)*, D クラス遺伝子として *SEEDSTICK (STK)* と *SHATTERPROOF1* および 2 (*SHPI, 2*), E クラス遺伝子として *SEPALLATA1-4 (SEPI-4)* などが報告されている (Becker and Ehlers, 2016). トマトにおいても ABC クラスの遺伝子はいくつか単離されている (Lozano et al., 2009). A クラス遺伝子として *MACROCALYX (MC)* が報告されており、この遺伝子の欠損株は葉様のがくを形成する。さらに *MC* は離層形成に重要な遺伝子であることも報告されている (Nakano et al., 2012; Yuste-Lisbona et al., 2016). B クラス遺伝子は *STAMENLESS (SL)* /*TAP3* が単離されており、この遺伝子の欠損株はがく様の花弁および、心皮様の雄蕊を形成する (Gómez et al., 1999; Quinet et al., 2014). C クラスの遺伝子は *TOMATO AGAMOUS1 (TAG1)* が知られており、この遺伝子の抑制体は異常な雌蕊および果実を形成し、胚珠や種子の形成が阻害される (Pnueli et al., 1994; Gimenez et al., 2016). D クラスの遺伝子は *TOMATO AGAMOUS like-II (TAGLII)* と *MADS-box PROTEIN3 (MBP3)* がシロイヌナズナ *STK* のオーソログ遺伝子として報告されており (Leseberg et al., 2008), さらにトマト *TAGLII* の発現抑制個体は種の発達を阻害することが分かっている (Ocarez and Mejía, 2016). そして、E クラスの遺伝子は *TOMATO MADS BOX5* および 29 (*TM5, 29*) などが報告されており、*TM29* の発現抑制個体はがく様の花弁と葯を形成し、雌蕊の形態にも異常がみられる (Ampomah-Dwamena et al., 2002; Lozano et al., 2009).

トマト果実は雌蕊の子房が肥大することで形成させるため、花器官の中でも雌蕊の形態に最も影響を受ける。そのため雌蕊の形態や特性が、その後形成される果実の形態

や特性をほぼ決定づけている。さらに、その雌蕊は心皮より形成されるため、雌蕊の形態や特性は心皮の形成に依存しているところが多い。先述したように、心皮数が増えると子室数が増えるのがその一例である。また、心皮は花芽分裂組織の中央から分化、発生する。花芽分裂組織は *WUS* とそれによって誘導される *CLV3* によって発達およびその大きさが制御されており、*WUS* および *CLV3*、さらに前述の *MADS-box* 遺伝子が複雑に関連し合い、各花器官を形成している (Alvarez-Buylla et al., 2010; Becker and Ehlers, 2016)。シロイヌナズナにおいて、*CLV*, *AG*, *ULTRAPETALA1 (ULT1)*, *PLURIPETALA (PLP)* の機能欠損個体は花芽分裂組織が大きくなり、心皮などの花器官の数が増加すると報告されており、この花器官の増加は花芽分裂組織における *WUS* の発現期間の延長に起因している (Lenhard et al., 2001; Carles et al., 2004; Running et al., 2004; Durbak and Tax, 2011)。その一方で、*WUS* の変異体は花芽分裂組織の大きさが小さくなり、雄蕊と心皮の数が減少する (Laux et al., 1996)。トマトにおいても、mini zinc finger protein をコードしている *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY (IMA)* の発現抑制組換え体は花芽分裂組織で *WUS* の発現期間を延長し、WT に比べて多くの心皮を形成すると報告されている (Sicard et al., 2008)。雌蕊の形態異常はシロイヌナズナにおいても、トマトにおいてもその後の果実発達に大きな影響を与える。つまり、トマト果実の形態形成や特性を評価する上で、雌蕊の形態形成や特性を評価することは極めて重要である。さらに、雌蕊の中には胚珠が形成され、それを保護している働きをしているため、雌蕊および心皮の形態異常は胚珠の形成 (稔性) に影響を与えることもある。シロイヌナズナの *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)* は心皮同士の接合に重要な遺伝子であり、その変異体は胚珠を形成することができない (Kamiuchi et al., 2014)。また、心皮形成に重要な遺伝子である *WUS* や *AG* は胚珠形成にも関わる遺伝子であり、トマトにおいて *WUS* の高発現や *TAG* の発現抑制は胚珠の形態異常をもたらすと報告されている (Sicard et al., 2008; Gimenez et al., 2016)。このように、心皮が形成され雌蕊が完成するまでに、多くの遺伝子が複雑に関連し働いていることが分かってきた。そして、心皮や雌蕊の形成に関わる遺伝子がいくつか単離されているが、その形成に関する詳しい分子制御メカニズムは未解明な部分が多い。さらに、単離され機能解析が進んでいる遺伝子は、そのほとんどがシロイヌナズナの遺伝子であり、トマトでの報告は少ない。例えば、花芽形成の ABC モデルに関して、シロイヌナズナでは遺伝子発現制御などの遺伝子間の相互関係も徐々に明らかになっているが (Becker and Ehlers, 2016)、トマトではいくつかの遺伝子が単離さ

れ、その機能解析がわずかに行われている程度である (Lozano et al., 2009). また、胚珠形成も雌蕊形成の重要なステージの 1 つであるが、シロイヌナズナ (Bencivenga et al., 2011; Yamada et al., 2016) に比べトマトではほとんど研究が進んでいない. *WUS* や *IMA*, そして *INNER NO OUTER (INO)* が胚珠形成へ関与することを示した報告はあるが (Sicard et al., 2008; Skinner et al., 2016), 他の遺伝子に関しては未だに報告されていない. トマトはシロイヌナズナとは異なり、新鮮な食用の果実 (液果) をその雌蕊より形成するため、雌蕊の形態が大きくトマト果実の品質に影響を与える. よって、トマトにおける雌蕊の形態形成メカニズムは、果実形態決定の 1 つの重要な因子として非常に有益な知見となり得る.

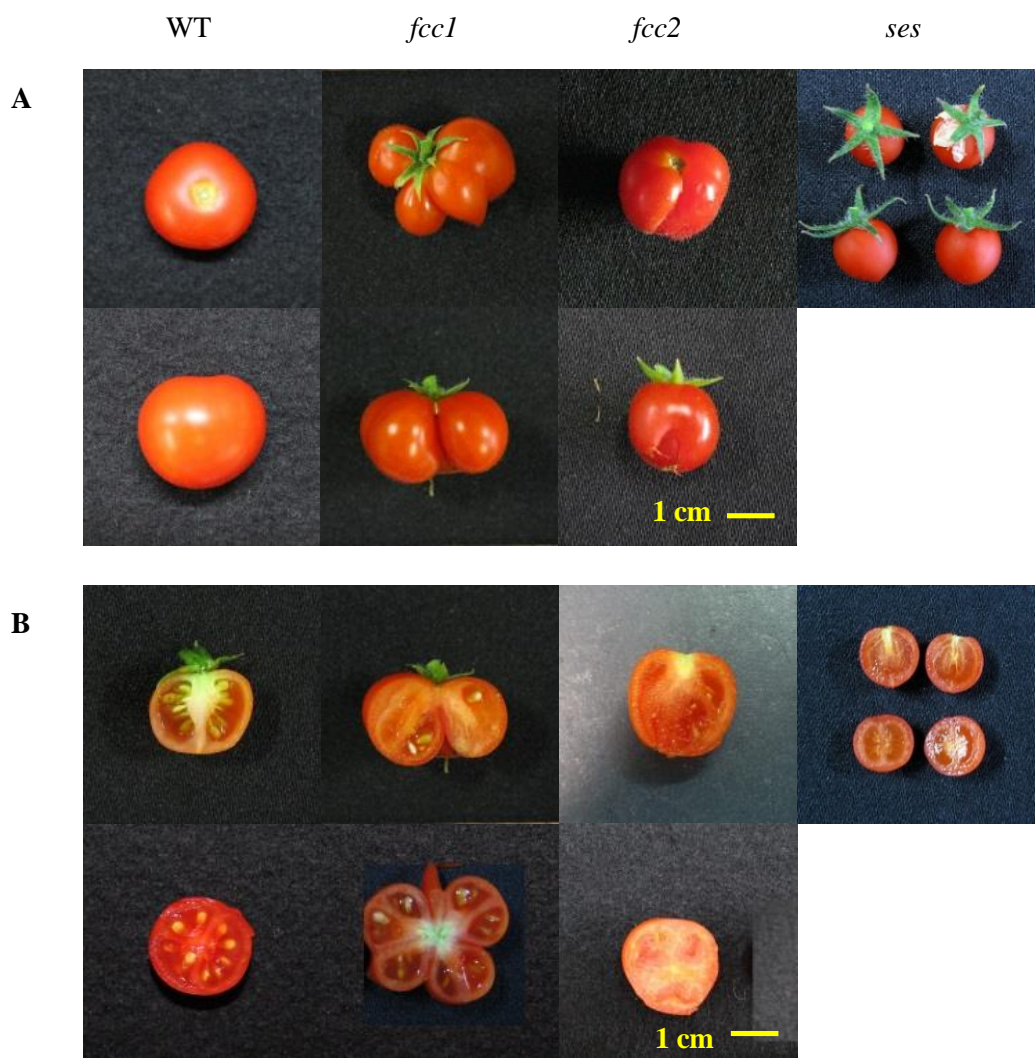
<これまでの研究と本研究の目的>

以上の背景から、心皮および雌蕊の形態形成も大きく果実の形態や大きさに影響を与えるため、心皮や雌蕊の形態形成は果実発達の初期ステージであるにとらえることができる. しかし、果実発達の全貌を明らかにし正しく理解するためには、受粉後の果実発達に比べて、受粉前の雌蕊および心皮の形態形成メカニズムの知見が明らかに不足している. そこで、本研究ではトマトにおける雌蕊および心皮の形態形成メカニズムを解明することを目的とした. そして、本研究ではトマトの心皮および雌蕊の形成に関与する新しい遺伝子を単離し、さらに解析することで、心皮や雌蕊の発達を制御する新しい分子メカニズムや分子ネットワークの発見を目指した. 先行研究 (羽尾, 修士論文 2014) において、筑波大学で整備されている矮性トマト品種 ‘Micro-Tom’ の変異体集団の中から雌蕊や果実形態に変異のみられる 3 系統の新規変異体 *fascated carpel 1, 2 (fcc1, 2)* と *sexual sterility (ses)* が単離され、形態学的、遺伝学的解析が行われた. 形態学的解析の結果、*fcc1* 変異体は心皮の形成枚数が増加することで複数の独立した雌蕊を形成し、*fcc2* 変異体は同様に心皮の形成枚数が増加し多重に重なった子房壁を形成した (図 II, III). 一方、*ses* 変異体は心皮の形成枚数が減少し、子室数が減少した. *ses* 変異体は両性不稔性を示し、花粉を形成せず、胚珠は未成熟であった (図 II, III). そして、遺伝学的解析の結果、*fcc1*, *fcc2*, *ses* 変異体の原因遺伝子はいずれも単因子劣性であることが判明した. 原因遺伝子を単離するために、生食用トマト品種 *Ailsa Craig* と変異体との交配 F₂ 集団を用いたマップベースクローニングと次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンスが行われた. それにより、それぞれの変異体の原因遺伝子候補が一つずつ単離

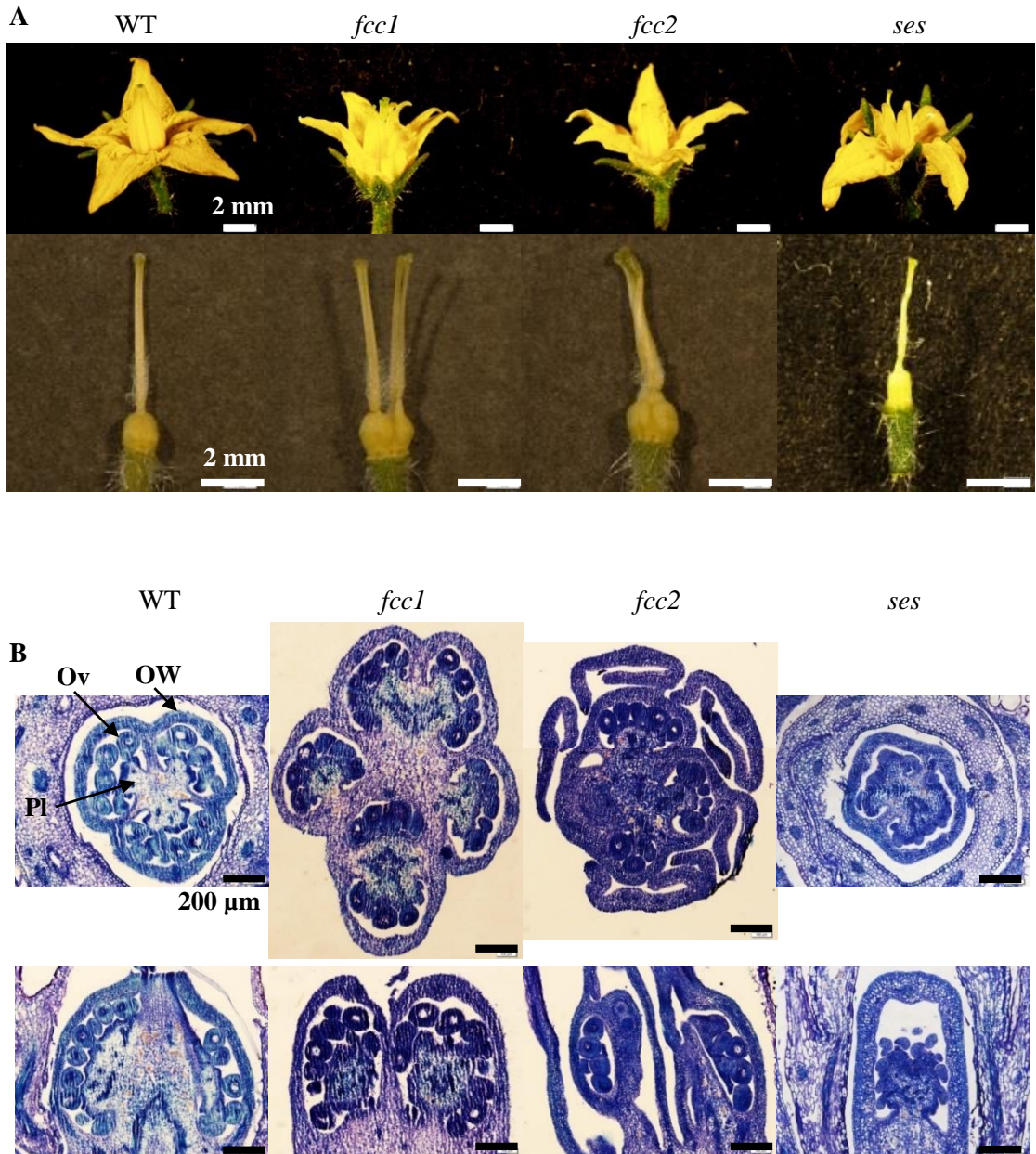
されている。本博士論文では、雌蕊および心皮形成に変異のみられる *fcc2* 変異体 (第 1 章) と *ses* 変異体 (第 2 章) において、単離された原因遺伝子候補の相補性の解析とその遺伝子の機能解析を行った。そして、その単離された遺伝子の雌蕊形成における役割と、他の既知の雌蕊形成に関与する遺伝子との関係性の一端を明らかにした。また、トマトの雌蕊形成の新しい分子メカニズムを構築した。



図I 'Micro-Tom' 野生株
'Micro-Tom' 野生株の播種後約2カ月の草姿. スケールバー = 10 cm.



図II 単離された変異体 (*fcc1*, *fcc2*, *ses*) および野生株 (WT) の果実形態
 A, 果実上面 (上段) と果実側面 (下段)
 B, 果実縦断面 (上段) と果実横断面 (下段)
 スケールバー = 1 cm.



図III 単離された変異体 (*fcc1*, *fcc2*, *ses*) および野生株 (WT) の花器および雌蕊の形態

A, 開花期の花器 (上段) とその雌蕊 (下段). スケールバー = 2 mm.

B, 開花期雌蕊の横断面 (上段) と縦断面 (下段). スケールバー = 200 μ m.

Ov, ovule 胚珠; OW, ovary wall 子房壁; Pl, placenta 胎座.

第 1 章

fasciated carpel 2 (fcc2) 変異体の解析

1.1 緒言

fcc2 変異体は筑波大学で作出されている ‘Micro-Tom’ 変異体集団の EMS 処理個体より、雌蕊形態に異常のみられる変異体として単離された個体である。先行研究 (羽尾, 修士論文 2014) が実施されており、形態学的解析により *fcc2* 変異体は 2 重の果皮および子房壁を形成することが明らかになっている。その形質は心皮の形成枚数が増えることに起因している。また、遺伝学的解析により *fcc2* 変異体の原因遺伝子は単因子劣性であることも明らかになっている。さらに、原因遺伝子の単離のために、‘Ailsa Craig’ との交配 F₂ 集団を用いたマップベースドクローニングおよび、変異体の全ゲノムシーケンス解析を実施している。その結果、*fcc2* 変異体は、第 1 染色体上に座乗している “*Solyc01g010240*” (*FCC2*) 上にミスセンス変異を持っており、*FCC2* が原因遺伝子の候補と推測されている。*FCC2* はそのアミノ酸配列より YABBY ファミリーをコードしており、転写因子として働くことが示唆される。トマトにおける YABBY ファミリーの遺伝子はすでに 9 つ単離されており (Huang et al., 2013; Han et al., 2015), *FCC2* はその中の *CRABS CLAW a* (*CRCa*) をコードしている。シロイヌナズナにおけるオーソログ遺伝子である *CRABS CLAW* (*CRC*) は心皮および蜜腺の形成に重要な遺伝子であり、その変異体である *crc-1* は長角果のサイズが小さくなり、蜜腺を形成しなくなると報告されている (Bowman and Smyth 1999; Lee et al., 2005a)。この心皮および蜜腺の形態異常はポピーやペチュニアなど他の双子葉植物でも報告されている (Orashakova et al., 2009; Lee et al., 2005b)。しかし、トマトにおける *CRC* の報告例は未だにない。また、先行研究においては、*fcc2* の原因遺伝子の証明とその原因遺伝子候補の *FCC2* の機能については明らかになっていない。そこで、本章では *fcc2* 変異体の原因遺伝子の相補性検定と *FCC2* の機能解析について記述する。

1.2 材料および方法

1.2.1 供試植物および栽培方法

トマトの矮性品種であるマイクロトム (*Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’) の野生株 (図 I) と EMS 処理によって作出された複数の雌蕊を形成する *fasciated carpel 2 (fcc2)* 変異体を用いた.

WT, 変異体及び各形質転換体の種子を一晩 1.5ml エッペンドルフチューブ内で吸水させて, 純水で湿らせたろ紙の上にその種子を播種した. 約 7 日後, 子葉が展開したのを確認し, 5×5×5 cm のロックウールキューブ (Grodan) へ移植し, 筑波大学生物農林学系 E 棟 5 階 E505 内の栽培室 (明期 16 時間, 暗期 8 時間, 25℃) で栽培した. 水耕栽培溶液として大塚ハウス A 処方 [大塚 1 号 1.5 g/l, 大塚 2 号 1 g/l] を用いた.

1.2.2 トマトゲノム DNA の抽出

1.2.2.1 簡易抽出

3~5 mm 角の若い成葉を 1.5 ml チューブに採取し, DNA 抽出液 (200 mM Tris-HCl (pH7.5), 250 mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS) を 300 μ l 入れ, マイクロペッスルでよくすり潰した. ボルテックスでよく攪拌した後, 1 分間遠心分離 (室温, 16,000 g) した. 遠心後もの上清 200 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移し, 冷えたイソプロパノール 200 μ l を加えてよく混和した. 5 分程度-30℃でインキュベートし, 5 分間遠心分離 (4℃, 16,000 g) した. 上清をデカントで捨て, 冷えた 70%エタノールを 700 μ l 加え, 10 分間遠心分離 (4℃, 16,000 g) した. 上清をデカントで捨て, チューブを室温で風乾させた後, 沈殿を 100 μ l の TE buffer に溶かした. 抽出したゲノム DNA は 4℃で保存した.

1.2.2.2 キットを用いた抽出

サザンブロット解析に用いるゲノム DNA の抽出は Maxwell 16 DNA Purification Kits (Promega) を用いた. 若い葉 5~6 枚を 1.5 ml チューブに採取し, 液体窒素で凍結させた後, マイクロペッスルを用いてよく破碎した. Kit 内の Lysis Buffer が入ったカートリッジに破碎した葉を入れ, カートリッジを Maxwell 16 にセットし, ゲノム DNA の抽出を行った. 抽出されたゲノム DNA を 1.5 ml チューブに移し, 4℃で保存した.

1.2.3 形質転換用コンストラクトの構築

1.2.3.1 遺伝子過剰発現 (Over expression (OX)) コンストラクトの構築

FCC2 遺伝子の過剰発現形質転換体を作成するため、*FCC2* 遺伝子の翻訳開始コドンから終始コドンまでを含む領域を遺伝子合成により作製した。WT 型と変異型の *FCC2* をそれぞれ導入し、WT 型のコンストラクトを〈*FCC2*-OX〉、変異型のコンストラクトを〈*mFCC2*-OX〉とした (図 1-1B, 1-2A)。バイナリーベクターの基本骨格は pRI 201-AN (TaKaRa) を用いた。

1.2.3.2 遺伝子発現抑制 (RNAi) コンストラクトの構築

1) エントリーベクターへの遺伝子導入 (TA クローニング)

FCC2 遺伝子の発現抑制形質転換体を作成するため、*FCC2* 遺伝子を標的とする RNAi コンストラクト (*FCC2*-RNAi) を構築した。WT の縦径 1 mm のつぼみより合成した cDNA (10 ng/μl) (羽尾, 修士論文 2014) をテンプレートとし、*FCC2* の CDS 領域を特異的に増幅させるプライマー (*FCC2*-RNAi-Fw および Rv, 表 1-1) を用いて、表 1-2 の条件で PCR を行った。アニーリング温度は 57°C、伸長時間は 30 秒とした。次に、その得られた PCR 産物 50 μl に Takara Ex Taq (TaKaRa) を 0.25 μl 加えてサーマルサイクラーで 98°C; 10 秒, 72°C; 20 分の反応を行い、PCR 産物の 3'末端に〈A, アデニン〉を付加した。さらに、その PCR 産物を 1%アガロースゲルおよび 1×TAE バッファーを用いて電気泳動を行い、目的の配列が特異的に増幅されていることを確認した。続いて、目的のバンドを電気泳動後のアガロースゲルから切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、付属のプロトコールに従い PCR 産物を精製した。

続いて、精製した PCR 産物をエントリーベクターである pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) に TA クローニングにより導入した。方法はキット付属のプロトコールに従った。その反応液 2 μl を氷上融解した大腸菌コンピテントセル (DH5α 株) に加え、付属のプロトコールに従い遺伝子導入した。選択培地にはスペクチノマイシン 100 mg/l に調製した LB 固形培地を用い、37°C で 12~16 時間培養した。

培養後、形成されたコロニーに目的のプラスミドが導入されていることを確認するため、コロニー PCR を行った。プライマーはエントリーベクター内の配列である M13-Fw と M13-Rv もしくはクローニングに用いた *FCC2*-RNAi-Rv プライマー (表 1-1) を用い、表 1-3 の条件で PCR を行った。その PCR 産物を電気泳動することでベクター導入の有無の確認し、コロニーの選抜を行った。

次に、コロニーPCR によって目的のプラスミドの導入が確認された大腸菌からプラスミドを精製した。スペクチノマイシン 100 mg/l の濃度に調製した LB 液体培地 3 ml に選抜した大腸菌を植菌し、37°C で 12~16 時間振とう培養した。そして、その培養液から PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) を用いてプラスミド精製を行い、分光光度計 (NanoDrop 2000) で濃度を測定した。

2) 導入遺伝子のシーケンス解析

目的の DNA 配列が正しく導入されていることを確かめるために、精製されたプラスミドをテンプレートに Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行った。表 1-4A の組成で反応液を作製し、表 1-4B で示した条件でシーケンシング PCR 反応を行った。プライマーは M13-Fw 及び M13-Rv を用いた。

次に PCR 産物をエタノール沈殿により精製した。1.5 ml チューブで PCR 産物 20 µl, 3M 酢酸ナトリウム 2 µl, 100%エタノール 50 µl を混和し、-30°C で 10 分間インキュベートした。その後、20 分間遠心分離 (4°C, 16,000 g) し、上清を捨て、140 µl の 70%エタノールを加えた。再度 10 分間遠心分離 (4°C, 16,000 g) し、上清を捨て、完全に乾燥するまで常温で静置した。乾燥したサンプルに Hi-Di Formamide を 20 µl 加えてよく攪拌した後、シーケンス解析用 96 ウェルプレートに全量移し、サーマルサイクラーを用いて 96°C で 3 分間熱処理した。熱処理後すぐに氷上に移し、ABI3130 (Applied Biosystems) を用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスデータは [Genetyx ver.11] を用いて解析し、正しく標的配列がクローニングできているプラスミドを選抜した。

3) バイナリーベクターの作製 (LR 反応)

続いて、LR 反応によりエントリーベクター内の標的配列をディスティネーションベクターである pANDA35HK vector に導入した。導入には GATEWAY Cloning 技術を利用し、LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen) を用いて、付属のプロトコールに従って行った。

LR 反応後の反応液 2 µl を大腸菌コンピテントセル (DH5α 株) に加えて、付属のプロトコールに従い遺伝子導入した。選択培地にはカナマイシン 50 mg/l に調製した LB 固形培地を用い、37°C で 12~16 時間培養した。培養後、形成されたコロニーに対して先述した方法と同様にコロニーPCR を行い、正しくプラスミドが導入されたコロニーを選抜

した. プライマーは gus-linker-Fw または gus-linker-Rv と FCC2-RNAi-Rv プライマーを用いて (表 1-1), 表 1-3 に示した条件で PCR を行った. 次に, 選抜されたコロニーの大腸菌をカナマイシン 50 mg/l の LB 液体培地 3 ml に植菌し, 37°C で 12~16 時間振とう培養した. 培養液からプラスミドを抽出し, さらに, シーケンスにより標的 DNA 配列が正しく導入されていることを確認した (上記の方法と同様). シーケンス解析には gus-linker 配列を認識するプライマー gus-linker-Fw および Rv を使用した (表 1-1). ここで構築したコンストラクトを 〈FCC2-RNAi〉とした (図 1-1B, 1-2B).

1.2.3.3 GUS 発現形質転換コンストラクトの構築

1) In-Fusion 法を用いた標的配列のクローニング

標的配列のクローニングは In-Fusion[®] HD Cloning Kit (TaKaRa) を用いて行った. 初めに, FCC2 のプロモーター領域 (2388 bp) をクローニングするために Nested PCR を行った. トマト WT のゲノム DNA をテンプレートにプライマー FCC2-Promoter-Nest-Fw および Rv (表 1-1) を用いて表 1-2 に示した条件で 1st PCR を行った. アニーリング温度は 51°C, 伸長時間は 1 分 30 秒とした. 続いて, その PCR 産物をテンプレートにプライマー FCC2-Promoter-Fw および Rv (表 1-1) を用いて表 1-2 で示した条件で 2nd PCR (フラグメントの増幅) を行った. アニーリング温度は 47°C, 伸長時間は 1 分 20 秒とした. 2nd PCR に用いたプライマーは TaKaRa ウェブサイト内の In-Fusion プライマーの設計 (https://www.takara-bio.co.jp/infusion_primer/infusion_primer_form.php) を利用し作製した. この時, 標的配列導入位置にある制限酵素サイトは残るように設計した.

次に, 2nd PCR の PCR 産物 5 µl に Cloning Enhancer (TaKaRa) 2 µl を加え, 37°C; 20 分, 80°C; 15 分の反応を行い, フラグメントにエンハンサーを付加した. また, バイナリーベクター (pIG121Hm) から 35S プロモーターを取り除き, さらに直鎖状にするために, バイナリーベクターに *Hind* III と *Xba* I を加えて (表 1-5) 37°C で一晩インキュベートした. その後, サーマルサイクラーを用いて 80°C で 20 分間処理し, 制限酵素を失活させた. 次に, Enhancer を付加したフラグメントと直鎖状にしたバイナリーベクターそして, 5× In-Fusion HD Enzyme Premix を表 1-6 の組成で調製し, サーマルサイクラーを用いて 50°C で 15 分間インキュベートした.

反応液 2 µl を前述と同じ方法で大腸菌コンピテントセル (DH5α) に導入した. カナマイシンを添加した LB 固形培地に形成されたコロニーに対して正しくプラスミドが導

入されたコロニーを選抜するため、コロニーPCRを行った。プライマーは FCC2-Pro-check-Fw と pIG121Hm-Rv (表 1-1) を用いて表 1-3 の条件で PCR を行った。選抜された大腸菌を液体培養し、プラスミドを抽出した。さらに、標的配列の DNA 配列と一致することをシーケンス解析によって確認した。この際、プライマーは pIG121Hm-Fw1 および Rv1 を用いた (表 1-1)。ここまでで構築された FCC2 のプロモーター領域が導入されたコンストラクトを〈FCC2p-GUS〉とした (図 1-1A, 1-2C)。

上記で構築された〈FCC2p-GUS〉にさらに、FCC2 のターミネーター領域を導入するために、FCC2 のターミネーター領域 (781 bp) のクローニングを行った。プライマーは FCC2-Terminator-Fw および Rv (表 1-1) を用いて、‘Micro-Tom’ WT のゲノム DNA をテンプレートに表 1-2 の条件で PCR した。アニーリング温度は 55℃、伸長時間は 1 分とした。このプライマーも上記同様 TaKaRa のウェブサイト制限酵素サイトが残るように設計した。PCR 産物を泳動したアガロースゲルから目的のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、PCR 産物を精製した。次に、〈FCC2p-GUS〉を直鎖状にするために、表 1-7 の組成で Sac I 処理を行い、37℃で 6 時間インキュベートした。その後、サーマルサイクラーを用いて 65℃で 30 分間処理し、制限酵素を失活させた。そして、表 1-6 に示した組成で In-Fusion 反応液を調製し、サーマルサイクラーを用いて 50℃で 15 分間インキュベートした。

反応液 2 µl を大腸菌コンピテントセル (DH5α 株) に導入し、カナマイシン添加 LB 固形培地に塗布した。形成されたコロニーに対してコロニーPCRを表 1-3 の条件で行い、正しくプラスミドが導入されたコロニーを選抜した。プライマーは FCC2-Terminator-Fw と pIG121Hm-Rv2 を用いた (表 1-1)。選抜された大腸菌よりプラスミドを抽出し、標的配列の DNA 配列と一致することをシーケンス解析によって確認した。この際、プライマーは pIG121Hm-Fw2 および Rv3 を用いた (表 1-1)。ここで構築された FCC2 のプロモーター領域およびターミネーター領域が導入されたコンストラクトを〈FCC2pt-GUS〉とした (図 1-1A, 1-2C)。

1.2.4 アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換

トマトへの形質転換はアグロバクテリウム法を用いて、当研究室のトマトの高効率形質転換プロトコール (Sun et al., 2006) に準拠して行った。

1.2.4.1 アグロバクテリウムへの形質転換 (プラスミド導入)

構築された各コンストラクトはエレクトロポレーション法によりアグロバクテリウム (GV2260 株) に形質転換した. エレクトロポレーション後の菌液に SOC 培地を 800 μ l 加えて, 28°C で 1 時間振とうして培養を行った. その後, カナマイシン 50 mg/l に調製した LB 固形培地に塗布し, シャーレをアルミホイルで包み 28°C で 2 日間培養した. 3) と同様の方法, 同様のプライマーでコロニーPCR を行い, 正しくコンストラクトが導入されているコロニーを選抜した. 選抜されたコロニーのアグロバクテリウムをカナマイシン 50 mg/l の LB 液体培地 3 ml に植菌し, 遮光して 28°C で 1 日振とう培養した. 続いて, グリセロールストック (15%) を作製するために, 培養液 350 μ l と 50%グリセロール 150 μ l を混和し, 液体窒素ですぐさま凍結させた. グリセロールストックは-80°C で保存した.

1.2.4.2 トマト種子の無菌播種

‘Micro-Tom’ WT の種子 200 粒程度を 50 ml コーニングチューブ内で, 10 倍希釈した花王キッチンハイター (次亜塩素酸ナトリウム系の洗浄剤) に 20 分程度浸け, 種子を表面殺菌した. 種子を滅菌水で 3 回すすいだ後, 滅菌水に浸してローテーターで回転させながら 2 日間吸水させた. 続いて, 吸水後の種子を播種用 MS 培地 [MS 培地, 3%スクロース, 0.3%ゲランガム, pH5.8] に, 1 プラントボックスあたり 25 粒ずつ播種した. 25°C, 16 時間日長の培養室で発芽させ, 子葉が完全に展開し, 本葉が数 mm 伸びてきた個体の子葉を形質転換に用いた.

1.2.4.3 アグロバクテリウム感染液の調製

構築したコンストラクトを保持するアグロバクテリウムのグリセロールストック 10 μ l もしくは 20 μ l を, カナマイシン 50 mg/l に調製した LB 液体培地 2 ml に植菌し, 暗黒下, 28°C で一晩振とう培養した. 培養液を 3000 rpm で 10 分間遠心して集菌し, 上澄みを捨て, さらに 100 mM アセトシリンゴン 80 μ l (0.16 mM) とメルカプトエタノール 40 μ l (0.8 μ l/ml) を溶かした液体 MS 培地 50 ml に再懸濁させた. この懸濁液をアグロバクテリウム感染液として使用した.

1.2.4.4 感染

無菌播種したトマトの子葉の端を 2 mm ほど切り取った後、子葉 1 枚につき 2 枚の切片を得られるよう、葉脈の垂直方向に素早く切断し、シャーレに移したアグロバクテリウム感染液に浸した。マイクロピペットで感染液をすべての子葉に回しかけ、15 分間静置し感染させた。

1.2.4.5 共存培養

滅菌したキムタオルにアグロバクテリウムに感染させた子葉切片をのせ、表面の余分な感染液を吸い取った。その後、切片を共存培地 [MS 培地, 3%スクロース, 0.3%ゲランガム, 10 μ M アセトシリンゴン, ゼアチン 1.5 mg/l, pH5.8] に葉の向軸面が培地に接するように置床した。シャーレは光が当たらないようにアルミホイルで包み、25℃の培養室で 3-4 日間 (切片の周辺にアグロバクテリウムが確認できるまで) 共存培養を行った。

1.2.4.6 カルス誘導

共存培養を行った切片を葉の向軸面が上になるようにカルス誘導培地 [MS 培地, 3%スクロース, 0.3%ゲランガム, ゼアチン 1.5 mg/l, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 100 mg/l, pH5.8] に移した。切片の切り口からカルスが形成され、十分な大きさ (直径 5 mm 以上) に成長するまで 2 週間おきに新しいカルス誘導培地と交換した。

1.2.4.7 シュート誘導

十分な大きさまで成長したカルスは子葉切片から切り離し、シュート誘導培地 [MS 培地, 3%スクロース, 0.3%ゲランガム, ゼアチン 1.0 mg/l, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 100 mg/l, pH5.8] に移した。培地は 2 週間おきに新しいものに交換した。

1.2.4.8 発根選抜

カルスから 1-2 cm のシュートが伸びてきたら、カルスを持ち込まないようにシュートの根元からメスで切り出し、発根選抜培地 [1/2 MS 培地, 3%スクロース, 0.3%ゲランガム, オーグメンチン 375 mg/l, カナマイシン 50 mg/l, pH5.8] に挿した。2 週間後、発根の有無にかかわらず、すべての根とシュートの根元を薄く切り落とし、新しい発根選抜培地に挿した。さらに 2 週間後、主根及び側根が形成された個体に関して順化を行った。

1.2.4.9 順化

発根選抜培地で発根した植物体をロックウールに移植し、急激に湿度を下げないようにラップをかぶせて、培養室で培養した。ラップは徐々に穴を空けながら 3-5 日間かけて外し、植物体を順化させた。

1.2.5 フローサイトメーターを用いた倍数性の確認

倍数性の確認には核の抽出・染色キット Partec CyStain UV precise P (Partec) および、フィルターPartec 50 µm CellTrics disposable filter (Partec) を用いた。0.5~1.0 cm 角のトマト本葉に Extraction Buffer を 400 µl 滴下し、カミソリを用いて細かく切り刻んだ。フィルターを通過させて葉断片を除去し、抽出液を試験管に集めた。そこに 1.2 ml の Staining Solution を加えて核を染色した。フローサイトメーターはプロイディーアナライザーPA 型 (Partec) を用い、WT の測定結果をコントロールとして、二倍体の選抜を行った。

1.2.6 導入遺伝子の確認とそのコピー数の調査

1.2.6.1 ゲノミック PCR による導入遺伝子の確認

形質転換体に目的の遺伝子が導入されていることを確認するためにゲノミック PCR を行った。簡易抽出 (1.2.2.1) により抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、導入遺伝子の有無を確認した。プライマーにはカナマイシン耐性遺伝子の全長を増幅するプライマー (NTPII-Fw および Rv, 表 1-1) と各導入遺伝子の特異的に増幅するプライマー (バイナリーベクターのコロニーPCR に用いたものと同様) を用いて表 1-8 および 1-3B の条件で PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルにより電気泳動し、予想されるサイズのバンドの有無を確認した。

1.2.6.2 サザンブロット解析による導入遺伝子のコピー数の確認

ゲノミック PCR により標的遺伝子の導入が確認された個体に対して、導入された数 (以下コピー数) を確認するためにサザンブロット解析を行った。サザンブロット解析に用いた試薬類の組成を表 1-9 にまとめた。

1) ゲノム DNA の制限酵素処理

T0 個体 (もしくは T1 個体) より 1.2.2.2 の方法でゲノム DNA を抽出し、分光光度計 (NanoDrop 2000) で濃度を測定した。ゲノム DNA と制限酵素 *EcoR* I を用いて表 1-10 に

示した組成液を作製し、37℃で 12-16 時間反応させた。反応後、反応液に 3M 酢酸ナトリウム 30 μ l と冷えたイソプロパノール 500 μ l を加え、よく攪拌して -20℃で 20 分間静置した。その後、20 分間遠心 (4℃, 16,000 g) し、上清を捨てた。そこに冷えた 70%エタノールを 700 μ l 加え、よく混和し 10 分間遠心 (4℃, 16,000 g) した。遠心後、上清を捨てて、室温で乾燥させ、15 μ l の DDW に溶解させた。

2) ゲノム DNA の転写

15 μ l の制限酵素処理ゲノム DNA にブロモフェノールブルー (BPB) と Orange G を含む 6 \times Loading dye (TOYOBO) を 3 μ l 加え、0.8% のアガロースゲル (SYBR Safe DNA gel stain を含む) により、50 V で 3 時間電気泳動した。マーカーには DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled (Roche) を用いた。泳動後バンドがスメアになっていることを確認し、ゲルをプラスチックタッパーに入れ DDW で洗浄した。洗浄後、脱プリン化溶液 [0.25 M HCl] に浸し、約 10 分間振とう (Loading dye の BPB の青色が完全に黄色に変わるまで) することで加水分解反応を行った。加水分解後のゲルを DDW で軽く洗浄し、変性溶液 [0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl] に浸して 30 分間振とうした。再度 DDW で洗浄し、20 \times SSC [3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate] に浸した。

転写はダウンロード法 (Chomczynski, 1992) に従って行った。ろ紙 4 枚とメンブレン Amersham Hybond - N⁺ (GE Healthcare) 1 枚を切りだし (11.1 cm \times 10 cm)、あらかじめ 20 \times SSC に浸しておいた。キッチンペーパー 1 ロール分を重ね、その上にろ紙 2 枚、メンブレン、ゲル、ろ紙 2 枚の順に重ねた。さらにパラフィルム (3 cm \times 12 cm) を 4 辺に置き、1 番上のろ紙の上に長く切り出したろ紙 (11.1 cm \times 40 cm) を端がそろうように重ねた。長いろ紙の反対の端をタッパー内の 20 \times SSC に浸るようにし、タッパーはメンブレンよりも高い位置に来るように置いた。メンブレンおよびろ紙の上に電気泳動で用いたゲルトレイと重し (約 300 g) を乗せ、2 時間かけて転写させた。転写されたメンブレンは 5 \times SSC で洗浄した後、キムタオル上で乾燥させ、UV crosslinker を用いて UV 固定 (70000 μ J/cm²)を行った。

3) 標識プローブの作製

PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) を用いて、遺伝子組換えのマーカー遺伝子である *NPTII* を検出するための DIG プローブの作製を行った。テンプレートには組換えに用

いたプラスミド DNA (pIG-121-hm) と, *NPTII* 遺伝子の全長を増幅するプライマー (NTPII-Fw および Rv, 表 1-1) を用いて表 1-11 に示した条件で PCR を行った. 1% のアガロースゲル (SYBR Safe DNA gel stain を含む) で電気泳動し, 本来のバンドサイズよりも大きくなることを確認した. 次に, PCR 産物 20 μ l を新しい PCR チューブに移し, サーマルサイクラーを用いて 100°C で 10 分間熱変性させた後, 素早く氷入りの 100% エタノールで冷却した. その後, High SDS Buffer 約 35 ml と混和し, *NPTII* を検出する DIG プロブのハイブリダイゼーションバッファーとした.

4) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションバックにメンブレンとあらかじめ 60°C に温めておいた High SDS Buffer [7% SDS, 50% Formamide, 5 \times SSC, 50 mM sodium phosphate, 2% Blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine] を入れてシールし, 45°C で 30 分間振とうした. その後, ハイブリバックから High SDS Buffer を取り出し, 60°C に温めておいた DIG プロブ (*NPTII*) ハイブリダイゼーションバッファーを入れてシールし, 45°C で一晩振とうさせた.

5) 抗 DIG 抗体によるブロッティング

ハイブリバックから DIG プロブを回収し, メンブレンをタッパーに移して 2 \times Wash Buffer [2 \times SSC, 0.1% SDS] で軽く洗浄し, 2 \times Wash Buffer に浸して 37°C で 7 分間振とうした. この洗浄を 2 度行った. 次に, 0.1 \times Wash Buffer [0.1 \times SSC, 0.1% SDS] で軽くすすぎ, 0.1 \times Wash Buffer に浸して 60°C で 10 分間振とうした. この洗浄も 2 度行った.

10% Blocking reagent と Buffer 1 を 1 : 4 の割合で混合し, Buffer 2 を作製した. メンブレンを Buffer 2 で軽く洗浄した後, Buffer 2 に浸して 37°C で 2-3 時間振とうした (水位が減らないようタッパーにラップをかけた). 続いて, Anti-Digoxigenin-AP (Roche) のチューブを 5 分間遠心 (4°C, 16,000 g) し, その上清 2.5 μ l を 100 ml の Buffer 2 に加えて抗体溶液を作製した. タッパー内の Buffer 2 を捨て, あらかじめ 37°C に温めておいた抗体溶液を全量入れ, 37°C で 30 分間振とうした.

6) シグナルの検出

0.3% の Tween 20 を加えた Buffer 1 を作製し, 37°C に温めたこの溶液でメンブレンを軽

く洗浄した後、溶液に浸して 37℃で 10-15 分間振とうした。これを 2 度行った。次に、溶液を Buffer 3 に入れ替えて、室温で 15 分間振とうした。ハイブリバックにメンブレンを移し、1%の CDP-Star Detection Reagent (Roche) を含む 1 ml の Buffer 3 をメンブレン表面全体に滴下し、乾燥させないようにして 5 分間放置した。その後、メンブレンをキムタオル上で乾燥させ、イメージングアナライザーLAS 4000 mini (FUJIFILM) を用いてシグナルの検出を行った。

1.2.7 形質転換体 T1 世代におけるホモザイガス、ヘテロザイガス、アザイガスの選抜

T0 世代 (カルスから再生した個体) で導入遺伝子が 1 コピーだった個体を選抜し、自殖させることで T1 世代の個体を作出した。この T1 個体は遺伝学的に分離し、導入遺伝子をホモで持つホモザイガス (ホモ, HO), ヘテロに持つヘテロザイガス (ヘテロ, HE), 導入遺伝子を持たないアザイガス (AZ)が得られる。ゲノミック PCR と定量的 PCR の手法を用いてこれらの個体の選抜を行った。

初めに T1 個体から簡易抽出 (1.2.2.1) でゲノム DNA を抽出し、1.2.6.1 の方法に従って PCR を行った。ここでバンドの見られたものは次の定量的ゲノミック PCR の実験へと進め、バンドの見れなかった個体を AZ とした。

定量的ゲノミック PCR には CFX96™ Real-Time PCR System (BIO-RAD) と THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。ゲノム DNA の濃度を分光光度計 (NanoDrop 2000) で測り、25 ng/μl になるよう TE Buffer で調製した。また、ゲノム DNA サンプルの中から 1 つ選び、スタンダード用の希釈系列 (50, 25, 12.5, 6.25 ng/μl) を調製した。表 1-12 に示した条件で、サンプル、スタンダード共に 2 反復 PCR を行った。プライマーは *NPTII* の一部を増幅するプライマー *NPTII-Copy No.-Fw* および *Rv* と、内部標準としてトマトゲノム内に 1 コピー存在することが知られている *Tomato Ascorbate Peroxidase (APX, Solyc06g005160)* の一部を増幅するプライマー *APX-Copy No.-Fw* および *Rv* を用いた (表 1-1)。PCR の解析は Pfaffl 法 (Pfaffl 2001) を用いて行い、増幅量の高いものをホモ、その半分程度であったものをヘテロと推定した。

1.2.8 パラフィン切片の作製と光学顕微鏡を用いた観察

光学顕微鏡で観察するためにパラフィンを用いて組織切片を作製した。縦径でステージ分けしたつぼみ (< 1 mm, 2-3 mm, 4-5mm, 6-7 mm) と開花期の花器の観察を行っ

た.

1.2.8.1 固定

30 ml コーニングチューブに組織片と約 5 ml の FAA (ホルマリン：氷酢酸：70%エタノール = 1:1:18) を入れ、デシケータで 10 分間の脱気を行った。脱気終了後にサンプルを軽く攪拌し、続けて 2 回目の脱気を行った。2 回行っても気泡が出てくる場合は、同様に 3 回目を行った。この時、FAA が突沸しないように注意した。その後、半日以上常温でインキュベートし固定した。

1.2.8.2 脱水

ブチルアルコール (Wako) を用いて、表 1-13 で示す 6 段階のブチルアルコール溶液を準備し、1 段階につき半日間以上浸けておき、脱水を行った (FAA→①→②→③→④→⑤→⑥→⑥)。

1.2.8.3 パラフィン置換と包埋

30 ml コーニングチューブから⑥溶液に浸かっている組織片を取り出し、100%ブチルアルコールの入った管ビンに移した。その管ビン恒温器 (60℃) に入れ、2 時間後に管ビン内のブチルアルコール (約 10 ml) と同量の融解したパラフィン (Wako) を加えた。そして、24 時間恒温器 (60℃) でインキュベートした。その後、恒温器から管ビンを取り出し、組織片をパラフィンごとシリコンケースに流し込み、組織片の向きを整えた後、常温で 1 日放置した。

1.2.8.4 切片の切り出し

1 日後パラフィンが固まったら、パラフィnbロックをメスで整形し、木製ブロックに溶けたパラフィンを用いて固定した。その後、ミクロトーム (MICROM HM325, Leica) を用いて 10 μm の厚さで切片を作製した。リボン上になった連続切片をスライドグラスに乗せて、切片とスライドグラスの間に蒸留水を流し込み、42℃に設定したホットプレートの上で 2~3 分ほどパラフィンを伸展させた。その後、スライドグラス上の余分な水分をキムワイプでふき取り常温で静置し、乾燥させた。

1.2.8.5 染色と封入

静置しておいたスライドガラスを再度 42℃のホットプレート上に置き、4 時間以上静置した。完全に乾燥したスライドガラスを 0.05%トルリジンブルー水溶液 (Wako) に 15 分間浸して染色し、蒸留水で洗い流して 2 時間乾燥させた。その後、染色した切片をドラフト内で 5~10 分間キシレン (Wako) に浸けてパラフィンを溶かした。キシレンから取り出した後、エンテラン・ニュー (Merk) を数滴たらし、カバーガラスをかけ封入した。その後ドラフト内で 1 日放置してから光学顕微鏡 (OLYMPUS BX53) で切片を観察した。

1.2.9 GUS 染色

2 種類の GUS 発現形質転換体〈FCC2p-GUS〉と〈FCC2-pt-GUS〉を用いて GUS 染色を行った。

1.2.9.1 固定と染色

染色サンプルをサンプリングし、冷やした 90%アセトンに氷上で 10 分間浸けて固定した。幼苗の子葉、胚軸および根を染色するときは、1.2.4.2 と同様の方法で無菌播種を行った。次に、表 1-14 で示した組成で GUS 染色液を調製し、染色液でサンプルを共洗いた後、GUS 染色液にサンプルを完全に浸した。続けて、15 分間脱気し、アルミで遮光して 37℃で一晩 (16 時間以上) インキュベートした。成熟葉および未熟葉を染色する際は、15 分間の脱気は行わなかった。

1.2.9.2 脱色

インキュベートしたサンプルを 70%エタノールに浸して、染色反応を停止させた。その後、1 時間おきに 80%エタノール→90%エタノール→100%エタノールに交換した。そして、完全に色素が抜けるまで 100%エタノールに浸した (1 日おきに新しいエタノールに交換した)。

1.2.9.3 透明化処理と観察

100%エタノールに浸かっているサンプルを水和させるため、1 時間おきに 90%→80%→70%→50%→30%エタノールに交換し、30%エタノールで一晩放置した。水和したサンプルを透明化液 [抱水クラロール 8 g; グリセロール 1 ml; 滅菌水 2 ml] に 30 分間浸し

た後、実体顕微鏡で観察した。

1.2.10 qRT-PCR による遺伝子発現解析

1.2.10.1 cDNA の合成

1) total RNA 精製

WT および各変異体と組換え体より縦径 1 mm 以下のつぼみと発達段階別の雌蕊をサンプリングした。雌蕊はつぼみの縦径と開花日を目安にし、5 つのステージ (縦径 3 mm, 4.5 mm, 6 mm, 開花 1 日前, 開花日) に分けた。サンプリングした組織はすぐに液体窒素につけて凍結させた。その組織から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。手順は付属のマニュアルに従った。

2) total RNA 内の DNA 除去

DNA-Free RNA Kit (ZYMO RESEARCH) を用いて total RNA に混在する DNA を除去した。手順は付属のマニュアルに従った。DNA 除去後に分光光度計 (NanoDrop 2000) を用いて DNA 除去後の total RNA 濃度を測定した。

3) cDNA 合成

SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて cDNA 合成を行った。表 1-15A の反応液中に DNA を除去した RNA を 2) で測定した濃度をもとに 2.0 µg 加え、表 1-15B の条件で反応させ、cDNA を合成した。そして、この合成した cDNA (100 ng/µl) を RNase free water で 10 倍希釈 (10 ng/µl) したものを発現量解析の実験で使用した。また、複数のオリジナル cDNA (100 ng/µl) を混合し、スタンダード用の 5 倍希釈 cDNA (20 ng/µl) を作製した。

1.2.10.2 遺伝子発現量の解析

1) qRT-PCR 用プライマーの作製とその信頼性の確認

qRT-PCR 用のプライマーは Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて各標的遺伝子の特異的に増幅するプライマーを作製した (表 1-16)。また、YABBY family 遺伝子の *CRCb*, *YAB1*, *YAB2*, *YAB3*, *YAB5a*, *YAB5b* 用のプライマーは Han et al (2015) の論文を参考に作製した

(表 1-16). プライマーの信頼性の確認のために 1.2.10.1 で合成した cDNA (20 ng/μl) をテンプレートに表 1-17 の条件で PCR を行った. PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し, 目的のサイズのシングルバンドが見られることを確認した.

2) qRT-PCR とデータの解析

qRT-PCR には CFX96™ Real-Time PCR System (BIO-RAD) と SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa) を用いた. スタンダード用の cDNA (20 ng/μl) を用いて, RNase free water で希釈系列 (10, 5, 1, 0.1 ng/μl) を作製した. 各測定サンプルとスタンダード溶液, および qRT-PCR 用のプライマーを用いて表 1-18 の条件で PCR を行った. 測定後, メルトカーブが単一のピークを示していることを確認した. 内部標準には *SAND* (*Solyc03g115810*, Expósito-Rodríguez et al. 2008) を用いた.

そして, 得られた Cq 値 (Threshold Cycle) をもとに, Pfaffl 法 (Pfaffl, 2001) を用いて遺伝子の相対発現量を求めた.

1.2.11 データベースを用いた FCC2 および関連遺伝子の解析

1.2.11.1 FCC2 タンパクとそのオーソログ遺伝子の解析

先行研究 (羽尾, 修士論文 2014) により予測された FCC2 のアミノ酸配列を用いて, National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Conserved Domain Search (CD-Search; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) を利用し, タンパクに保存されているドメインを検索した. そして, FCC2 のアミノ酸配列をもとに Sol Genomics Network (SGN; <http://solgenomics.net/>) のサイトを用いて Potato, Pepper, Eggplant, Tobacco のオーソログ遺伝子を検索し, The Arabidopsis Information Resource (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>) のサイトを用いて *Arabidopsis* のオーソログ遺伝子を検索した. それらのアミノ酸配列を GENETYX (Ver. 11) を用いて解析した.

1.2.11.2 プロモーターおよびターミネーター領域の解析

FCC2/CRCa (*Solyc01g010240*) および *CRCb* (*Solyc05g012050*) の遺伝子上流 5000 bp と下流 2000 bp を SGN よりダウンロードし, センス鎖およびアンチセンス鎖に存在する AGAMOUS (AG) および LEAFY (LFY) の認識配列を検索した.

1.2.11.3 トマト YABBY family 遺伝子の系統樹作成

SGN より YABBY 遺伝子のアミノ酸配列を入手し、その配列を Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) を用いてアライメントし、UPGMA 法で系統樹を作成した。

1.3 第1章 概要

第1章では EMS 処理によって作出された *fcc2* 変異体を用いて, 原因遺伝子の同定とその遺伝子の機能解析を行った. *fcc2* 変異体の原因候補遺伝子 *FCC2* は YABBY protein をコードしており, その中の zinc finger domain 内にロイシン (Leu) からヒスチジン (His) へのアミノ酸置換が生じていた. 置換されたロイシンは植物や他の YABBY family 遺伝子で広く保存されている遺伝子であり, *fcc2* 変異体のアミノ酸置換は *FCC2* の機能に影響を与えていると強く示唆される. そして, *fcc2* 変異体の原因遺伝子候補 *FCC2* (*Soly01g010240*) の遺伝子発現抑制体 (*FCC2*-RNAi 組換え体) を作出した. その結果, *FCC2*/*CRABS CLAWa* (*CRCa*) およびそのパラログ遺伝子である *CRCb* の発現が抑制された *FCC2*-RNAi 組換え個体は多重に重なりあった子房壁を形成し, 心皮の合成が WT に比べて増加していることが示された. この心皮が過剰に形成される表現型が *fcc2* 変異体の表現型と類似していたため, 原因候補遺伝子の *FCC2* は *fcc2* 変異体の原因遺伝子である可能性が高いと示唆される. さらに, *FCC2*-RNAi 組換え個体の心皮の合成は雌蕊の形成が完了した後も継続され, 花芽分裂組織様の組織を持つ果実様組織が形成された. また, 縦径 1 mm のつぼみおよび発達段階別の雌蕊を用いた遺伝子発現解析により, *fcc2* 変異体および *FCC2*-RNAi 組換え個体で胚珠の形成を制御しているトマト D クラス遺伝子 (*TOMATO AGAMOUS LIKE11* (*TAGL11*) と *MADS BOX PROTEIN3* (*MBP3*)) の発現が減少していることが分かった. 雌蕊形成に関与してる他のクラスの遺伝子 (C クラス, E クラス) には大きな発現の変化はみられなかった. よって, *fcc2* 変異体および *FCC2*-RNAi 組換え体では, WT に比べて心皮形成を誘導する複合体 (C クラス+E クラス複合体) が増加し, 胚珠を誘導する複合体 (D クラス+E クラス複合体) が減少すると考えられる. この複合体の割合の変化が過剰な心皮の合成を誘導していると示唆される. この心皮の過剰形成のメカニズムは, これまでに単離されている心皮形成が過剰になる変異体とは異なっている. また, GUS 染色の結果, *FCC2*/*CRCa* は形成初期の雌蕊の子房壁で強く発現していることが分かった. そして, *CRCa* および *CRCb* のプロモーターおよびターミネーターには *AGAMOUS* (*AG*) と *LEAFY* (*LFY*) の認識配列が多数存在し, *AG* および *LFY* のトマトオーソログ遺伝子 (*TAG* と *FA*) によって発現制御を受けていると考えられる.

以上のことから、*FCC2CRCa* は形成された心皮 (子房壁) で発現し、トマト D クラス遺伝子の発現を誘導して、心皮形成ステージから胚珠形成ステージへ移行させる働きをしていると示唆される。

また、トマトの心皮は最終的な果実形態を決定する大きな要因の一つであり、心皮形成を制御することができれば、奇形果の減少や果実形態の自在な制御が可能になると期待される。

表1-1 クローニングに用いたプライマーリスト

プライマー名	目的	プライマー配列 (5'-3')
FCC2-RNAi-Fw	RNAi コンストラクト	TCCTCATCTCCTAATTCCTCTTGT
FCC2-RNAi-Rv	RNAi コンストラクト	TTGCTTCACTCCTCCAAAGC
FCC2-Promoter-Nest-Fw	プロモーター領域のクローニング (1 st PCR)	CTGTTGTTAGAATGGGAGATTC
FCC2-Promoter-Nest-Rv	プロモーター領域のクローニング (1 st PCR)	AATAATAATAATAATACGTACCTCG
FCC2-Promoter-Fw	プロモーター領域のクローニング (2 nd PCR)	GATTACGCCAAGCTTCTCAAAATATTGCATCTAACTT
FCC2-Promoter-Rv	プロモーター領域のクローニング (2 nd PCR)	GATCCATGTTCTAGAATATATAAGTAGGCAAGTATATATATT
FCC2-Pro-check-Fw	コロニーPCR	TTCGAGGAATAGTCCAAAAGA
pIG121Hm-Fw1	シーケンシング	CAATCGGTTGAATGTCGC
pIG121Hm-Fw2	シーケンシング	AGCCTCGGAATTGCTAC
pIG121Hm-Rv1	コロニーPCR / シーケンシング	GGTTGGGGTTTCTACAGGA
pIG121Hm-Rv2	コロニーPCR	TAGATGACACCGCGCGGATA
pIG121Hm-Rv3	シーケンシング	GCTCCACCATGTTGACGGAT
FCC2-Terminator-Fw	ターミネーター領域のクローニング	CGGGAATTGCTACCGAGCTCAATTTATGGAATAATTCTACTTC
FCC2-Terminator-Rv	ターミネーター領域のクローニング	GATCGGGGAAATTCGAGCTCTTGATTGATCGATAAGATTATTI
M13-Fw	コロニーPCR / シーケンシング	GTAAAACGACGGCCAGT
M13-Rv	コロニーPCR / シーケンシング	CAGGAAACAGCTATGAC
gus-linker-Fw	コロニーPCR / シーケンシング	ATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTG
gus-linker-Rv	コロニーPCR / シーケンシング	AAGCCAGTAAAGTAGAACGGTTTG
NPTII-Fw	遺伝子導入確認	ATGATTGAACAAGATGGATTGCAC
NPTII-Rv	遺伝子導入確認	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
NPTII-Copy No.-Fw	定量的ゲノミックPCR	CCGGCTACCTGCCCCATTC
NPTII-Copy No.-Rv	定量的ゲノミックPCR	CGACAAGACCGGCTTCAT
APX-Copy No.-Fw	定量的ゲノミックPCR	TTTACTTGTATATTCGAAGTGTGCCA
APX-Copy No.-Rv	定量的ゲノミックPCR	ACAACTGCAAAATTAGAATCTAGTTGGTA

表1-2. A KOD-Plus-Neoを用いたPCR反応液の調製

10 × PCR Buffer	2.0 µl
dNTP Mixture (2 mM)	2.0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.2 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl
DDW	12.9 µl
KOD-Plus-Neo (TOYOBO)	0.4 µl
Template	0.5 µl
Total	20.0 µl

表1-2. B PCR条件

94°C	2 min	} ×35 cycles
98°C	10 sec	
X°C	30 sec	
68°C	Y	
68°C	5 min	
4°C	∞	
X, アニール温度		
Y, 伸長時間		

表1-3. A コロニーPCRの反応液の調製

Go-taq (Promega)	5.0 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl
DDW	4.0 µl
Total	10.0 µl

表1-3. B PCR条件

95°C	2 min	} ×35 cycles
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

表1-4. A シーケンス用PCR反応液の調製

Plasmid	X μ l
5 \times sequencing buffer	4.0 μ l
Big Dye Terminator	0.5 μ l
primer (3.2 μ M)	1.0 μ l
DDW	14.5 - X μ l
total	20.0 μ l

Plasmidは容量が約150 ngになるよう調節した.

表1-4. B シーケンス用PCR条件

90°C	1 min	} $\times 25$ cycle
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	
4°C	∞	

表1-5 プラスミドベクターの制限酵素処理

10 \times Buffer 2 (BioLabs)	2.0 μ l
<i>Hind</i> III	0.3 μ l
<i>Xba</i> I	0.3 μ l
Plasmid	18.0 μ l
Total	20.6 μ l

表1-6 In-Fusion反応液の組成

5 \times In-Fusion HD Enzyme Premix	2.0 μ l
Linearized Vector	X μ l
Cloning Enhancer-Treated or Gel Extracted PCR Fragment	Y μ l
MQ	up to 10.0 μ l
Total	10.0 μ l

X, Linearized Vectorの量が約200 ngになるよう調製した.

Y, Enhancerを処理した場合は2 μ l, ゲル抽出した場合約は100 ngになるよう調製した.

表1-7 プラスミドベクターの制限酵素処理

10 \times Buffer L (TOYOBO)	2.0 μ l
<i>Sac</i> I	0.3 μ l
Plasmid	17.7 μ l
Total	20.0 μ l

表1-8 Genomic PCRの反応液の調製

Go-taq	5.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
DDW	3.5 μ l
Genome DNA	0.5 μ l
Total	10.0 μ l

表1-9 サザンブロット解析に用いた試薬類の組成

試薬名	組成
脱プリン化溶液	0.25 M HCl
変性溶液	0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
20 × SSC	3 M NaCl, 0.3 M Sodium Citrate
High SDS Buffer	7% SDS, 50% Formamide, 5 × SSC, 50 mM sodium phosphate, 2% Blocking reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine
2 × Wash Buffer	2 × SSC, 0.1% SDS
0.1 × Wash Buffer	0.1 × SSC, 0.1% SDS
Buffer 1	0.15 M NaCl, 0.1 M Maleic acid, pH 7.5 (7.5 g/L NaOH)
Buffer 2	10% Blocking reagent と Buffer 1 を1:4で混合
Buffer 3	0.1 M Tris, 0.1 M NaCl, pH 9.5
10% Blocking reagent	20 g Blocking reagent, 200 ml Buffer 1

表1-10 ゲノムDNAの*EcoR* I処理

Genome DNA	X μ l
DDW	269 - X μ l
<i>EcoR</i> I (10 units/ μ l)	1 μ l
10 × H buffer	30 μ l
Total	10.0 μ l

X, ゲノムDNAが10 μ gになるよう調製した.

表1-11. A DIGプローブ作成用PCRの反応液の調製

PCR Buffer	5.0 μ l
PCR DIG Labeling Mix	5.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	2.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	2.5 μ l
Enzyme Mix	0.75 μ l
DDW	33.25 μ l
Plasmid DNA	1.0 μ l
Total	50.0 μ l

表1-11. B PCR条件

95°C	7 min	} ×35 cycles
95°C	30 sec	
56°C	30 sec	
72°C	1 min 30 sec	
72°C	7 min	
4°C	∞	

表1-12. A 定量的ゲノミックPCRの反応液の調製

SYBR qPCR Mix (TOYOBO)	10.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.6 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.6 μ l
MQ	7.8 μ l
Genome DNA (25 ng/ μ l)	1.0 μ l
Total	20.0 μ l

表1-12. B PCR条件

95°C	1 min	} × 40 cycles
95°C	15 sec	
60°C	30 sec	

表1-13 脱水に用いた6段階の反応溶液

溶液	ブチルアルコール	エタノール	DW
①	10 ml	40 ml	50 ml
②	20 ml	50 ml	30 ml
③	35 ml	50 ml	15 ml
④	55 ml	45 ml	0 ml
⑤	75 ml	25 ml	0 ml
⑥	100 ml	0 ml	0 ml

表1-14 GUS染色液の組成

	分量	終濃度
リン酸バッファー (pH7.0)	2.5 ml	100 mM
EDTA (pH8.0)	100 μ l	10 mM
フェロシアン化カリウム (50 mM)	500 μ l	5 mM
フェリシアン化カリウム (50 mM)	500 μ l	5 mM
10% トリトンX-100	50 μ l	0.10%
X-Gluc (20 mg/ml)	125 μ l	0.5 mg/ml
MQ	1225 μ l	
Total	5.0 ml	

X-Glucは*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解

表1-15. A cDNA合成反応液の調製

5 \times VILO Reaction mix	4 μ l
10 \times SuperScript Enzyme mix	2 μ l
RNA (2.0 μ g)	X μ l
RNase-free water	14-X μ l
total	20 μ l

X, RNAの量が2.0 μ gになるように調製した.

表1-15. B cDNA合成反応条件

25°C	10 min
42°C	60 min
85°C	5 min
4°C	∞

表1-16 qRT-PCRに用いたプライマーリスト

Primer name	Target gene	Soylc ID	Primer Sequence (5'-3')	
			Forward	Reverse
FCC2-qRT-1	<i>FCC2/CRCa</i> (※1)	<i>Soylc01g010240</i>	GCGTATTAAAGCAGCACATCCAC	TCTCAGCCAAGGTCCCATT
FCC2-qRT-2	<i>FCC2/CRCa</i> (※1)	<i>Soylc01g010240</i>	AGAAGCTTTTCAGTGCAGCAG	CTTCCAGTGCAGTAGAATTATTC
	<i>YAB1</i>	<i>Soylc01g091010</i>	CAAAGCCACCAGTCGCAACAGA	CGTTGGATCTCGCTTGATGAATCG
	<i>YAB2</i>	<i>Soylc06g073920</i>	CAC TTGACATGACATATTCCTCTCTTC	ATGGAACGCTAACC GAAGAATTG
	<i>CRCb</i>	<i>Soylc05g012050</i>	GCTTCCATCTGCCTACAATCG	GCTTCTCTATGTGGTATCTCTGG
	<i>YAB3</i>	<i>Soylc08g079100</i>	CACCTTCCTCCTCCACCTCCTT	GTCCACATCGAACCGTCACAGT
	<i>YAB5a</i>	<i>Soylc07g008180</i>	TATTGTTCTTGC GGTGAGTGTTCCAT	GCCACGAAGCAGAAAGAGGAC
	<i>YAB5b</i>	<i>Soylc12g009580</i>	TTGTGGTCCGTTAATATGGCTGCT	GAGTAGAGTTGTTGTGATGGATGATGAAG
	<i>INO</i>	<i>Soylc05g005240</i>	TACCCCAACATGACTCACAAGC	TTGTATCTCTTGGGACCATGG
	<i>FAS</i>	<i>Soylc11g071810</i>	AGCTCTACCCCTTCAAGATGTTT	CGTTGTCTTTTCTCTGGTGGA
	<i>WUS</i>	<i>Soylc02g083950</i>	AAGAAGAGGCTCATTGCTGCTG	ACCCCATGTGAAGATGGTGATG
	<i>CLV1/FAB</i>	<i>Soylc04g081590</i>	CTCGCCAAATTC TTGCAGGATG	TTCACCTACTGGCTTGTGACC
	<i>CLV2</i>	<i>Soylc04g056640</i>	GACACAGCTCAACTTGTCACAC	ATGCCTCGACAATCCTACTTGG
	<i>CLV3</i>	<i>Soylc11g071380</i>	GCTCCTGTGAAATCCTAAACAG	TGATGCAATGGATCAGGACCAG
	<i>CLE3</i>	<i>Soylc02g067550</i>	GCAGCCAAAACAGTTACTGGAAC	TCAAGCTCGGATGCGTGTATC
	<i>CLE9</i>	<i>Soylc06g074060</i>	GCTGCGTGATCACTTCATTCAC	TGATGATGCAAAGGGTCTGGAC
	<i>FIN/HPAT3</i>	<i>Soylc11g064850</i>	CCTCTTCCTGAAGGATTGGATCG	AGATCTCCACGAGCCAAGTTTG
	<i>BEL1-like</i>	<i>Soylc08g081400</i>	TGATGGAGACTCATCCTTGGAG	CCAGTTTGGCGAGCTAAAATG
	<i>FW2.2</i>	<i>Soylc02g090730</i>	GAGCTTAAGAACC GTGGCTTTG	GCATACATTTACCTGGTCATGC
	<i>FW3.2</i>	<i>Soylc03g114940</i>	GCTGGAAATGCTGCAGATGAAG	CCAAC TTCAGCGTCGATTTCAC
	<i>TAG1</i>	<i>Soylc02g071730</i>	GCAGAAAGAGGGAAGTTGATTACAC	GTCTAGGGTAATGGTTGTTGGTTTG
	<i>TAGL1</i>	<i>Soylc07g055920</i>	TGGAGGAAGTGGTGGAGGA	CAGCATGGTGTCTTGTACCTATC
	<i>TAGL11</i>	<i>Soylc11g028020</i>	TTTCTCTACTCGTGGTCGACTC	TGTACGCACTAGACGTTTCTGC
	<i>MBP3</i>	<i>Soylc06g064840</i>	ACCTCTAATGCTTGACCACTC	AATCCTTCACCAACCAGATGCC
	<i>TM5</i>	<i>Soylc05g015750</i>	AAGCAATTGCAGCGATCACAG	GGCTTCGTTCAATGCATGTTCC
	<i>TM29</i>	<i>Soylc02g089200</i>	TCCCTCAAACACATTAGGTCCAC	ATTGAGGATGTTGCTGCTGACC
	<i>SAND</i>	<i>Soylc03g115810</i>	TTGCTTGGAGGAACAGACG	GCAAACAGAACCCCTGAATC

※1, FCC2-RNAi組換え体の発現解析には‘FCC2-qRT-2’をそれ以外では‘FCC2-qRT-1’を用いた。

表1-17. A プライマー評価PCRの反応液の調製

Go-taq (Promega)	10.0 µl
Forward Primer (10 µM)	0.8 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.8 µl
MQ	7.9 µl
cDNA (20 ng/µl)	0.5 µl
Total	20.0 µl

表1-17. B PCR条件

95°C	2 min	} × 40 cycles
95°C	30 sec	
60°C	30 sec	
72°C	30 sec	
4°C	∞	

表1-18. A qRT-PCRの反応液の調製

SYBR Premix EX Taq II (TaKaRa)	10.0 µl
Forward Primer (10 µM)	0.8 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.8 µl
RNase Free Water	7.4 µl
cDNA (10 ng/µl) or Standard	1.0 µl
Total	20.0 µl

表1-18. B PCR条件

95°C	30 sec	} × 40 cycles
95°C	5 sec	
60°C	30 sec	

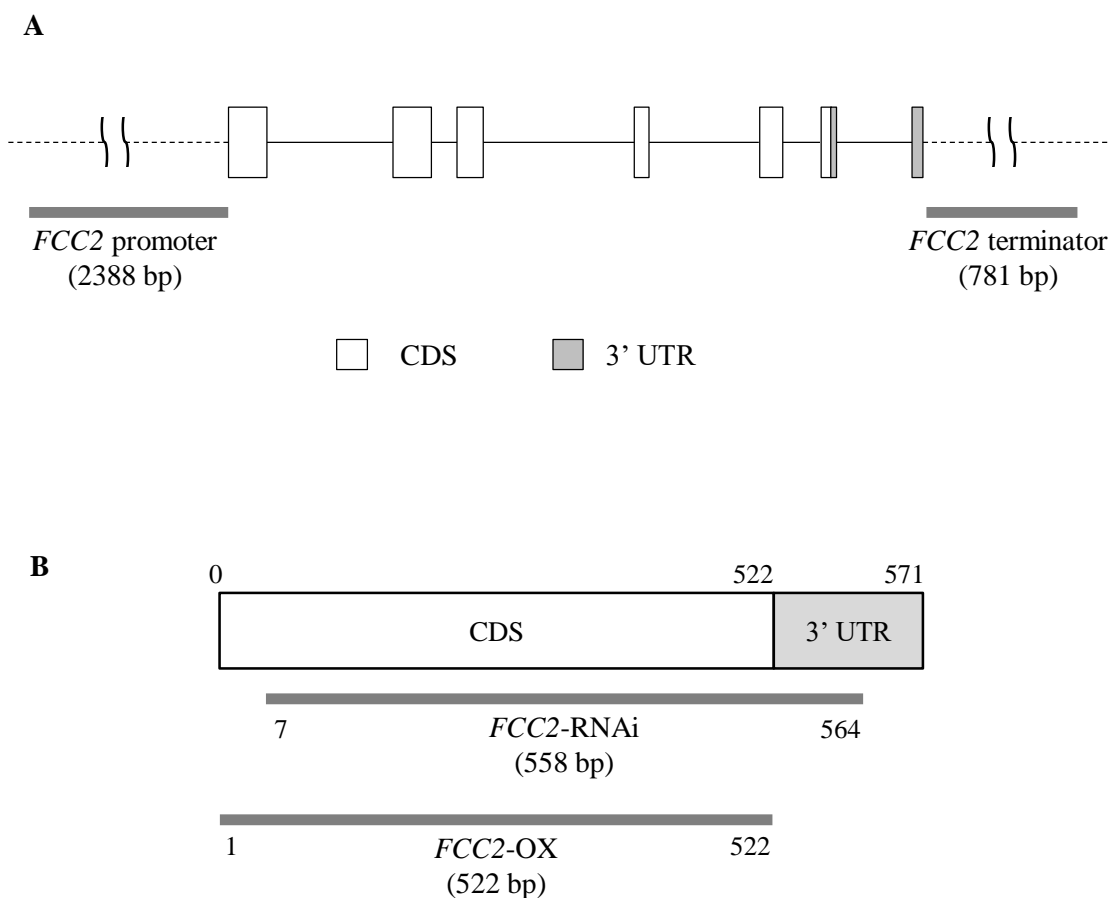


図1-1 形質転換体作製に用いたクローニングサイト

A, *FCC2*のゲノム構造とゲノムDNAからクローニングしたクローニングサイト. ボックス, エキソン; 実線, イントロン; 破線, *FCC2*の上流および下流; 灰色バー, クローニング領域.

B, *FCC2*のmRNA構造と合成cDNAからクローニングしたクローニングサイト. 灰色バー, クローニング領域.

bp, base pair; CDS, coding sequence 翻訳領域; UTR, untranslated region 非翻訳領域.

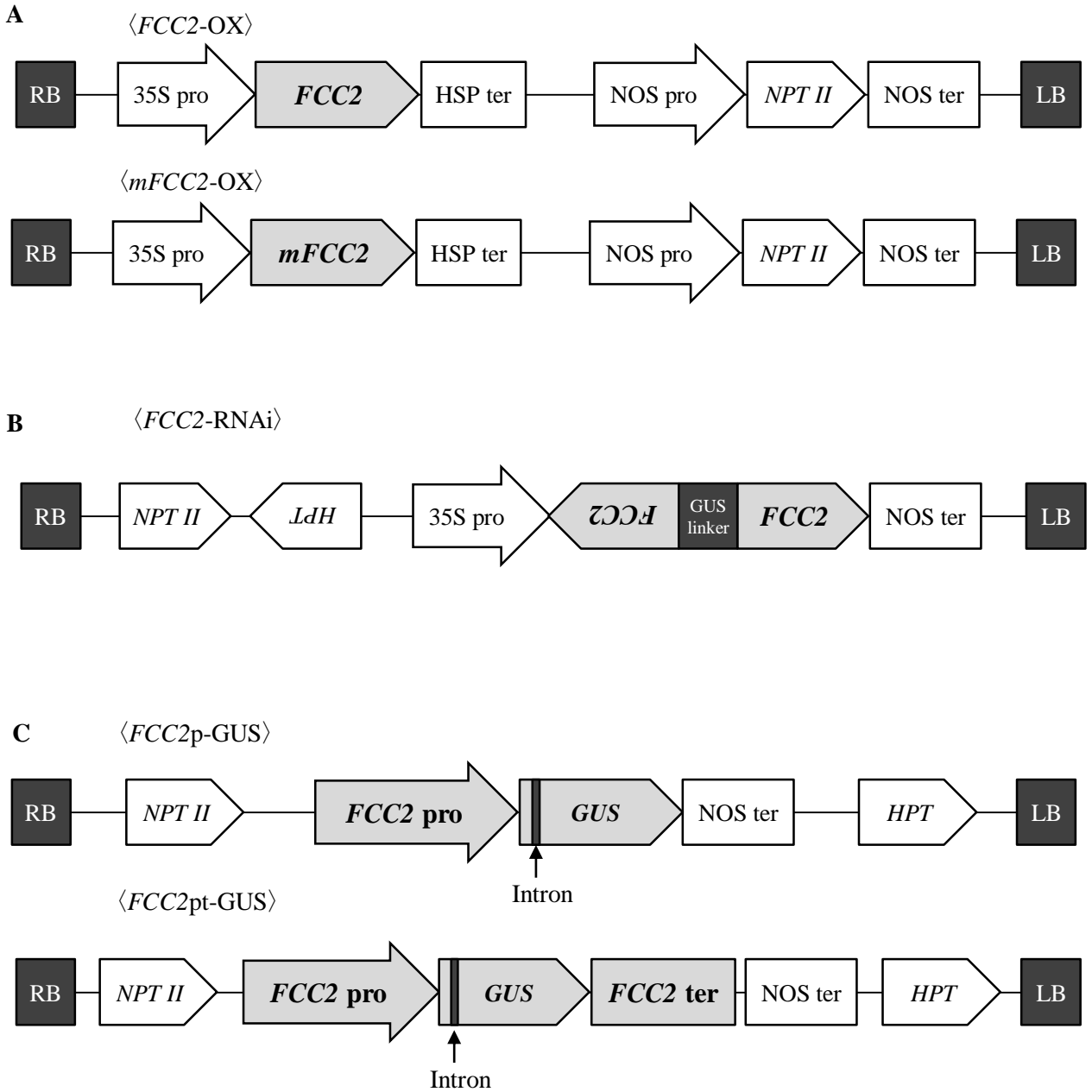


図1-2 構築したコンストラクト

A, *FCC2*過剰発現用コンストラクト. B, *FCC2*発現抑制用コンストラクト. C, *GUS*発現解析用コンストラクト.

RB, right border; LB, left border; *NPT II*, カナマイシン耐性遺伝子; *HPT*, ハイグロマイシン耐性遺伝子; 35S pro, CaMV35Sプロモーター; pro, プロモーター; ter, ターミネーター.

第 2 章

sexual sterility (ses) 変異体の解析

2.1 緒言

ses 変異体は筑波大学で作出されている ‘Micro-Tom’ 変異体集団のガンマ線照射個体より単為結果を示す個体として単離された変異体である。先行研究 (羽尾, 修士論文 2014) により, *ses* 変異体は花粉を形成せず, さらに未成熟な胚珠を形成することから両性不稔性を示すことが分かっている。そして, 雌雄不稔性を示すにも関わらず果実を形成することから単為結果性を有していることが明らかになっている。また, 遺伝学的解析により *ses* 変異体の原因遺伝子は単因子劣性であることが分かっている。さらに, 原因遺伝子の単離のために, ‘Ailsa Craig’ との交配 F₂ 集団を用いたマップベースドクローニングおよび, 変異体の全ゲノムシーケンス解析を実施している。その結果, *ses* 変異体には, 第 7 染色体上に座乗している “*Solyc07g063670*” (*SES*) 上に 13 bp の欠損が見つかり, フレームシフトにより本来より短いタンパクが合成されていると示唆されている。また, *SES* はそのアミノ酸配列より Plant transcription factor NOZZLE をコードしており, 転写因子として働くこと示唆されている。シロイヌナズナにおけるオーソログ遺伝子である *SPOROCTELESS/NOZZLE* (*SPL/NZZ*) は花粉および胚珠の形成に重要な遺伝子であることが報告されている (Schiefthaler et al., 1999; Liu et al., 2009)。さらに, *SPL/NZZ* は EAR モチーフを持ち, *TOPPLESS* (*TPL*) と複合体を形成することで, 転写抑制因子として生体内で働いていると報告されている (Chen et al., 2014; Wei et al., 2015)。しかし, トマトにおける *SPL/NZZ* の報告例は未だにない。一方, トマトにおいては, シロイヌナズナ *DYSFUNCTIONAL TAPETUM* (*AtDYT1*) のホモログ遺伝子である *Tomato Male Sterile 1035* (*MS1035*) が減数分裂とタペート組織の形成に重要であることが報告されている (Zhang et al., 2006; Jeong et al., 2014)。そして, *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY* (*IMA*) は *WUS* の発現を抑制し, 花芽形成の ABC モデルにおける D クラス遺伝子の発現を誘導することが報告されており, *IMA* の発現抑制個体は心皮と胚珠形態に異常がみられることが分かっている (Sicard et al., 2008)。しかし, トマトにおける配偶子形成に関する報告は少なく, 未だに未解明な部分が多い。そこで, 本章では配偶子形成に変異のある *ses* 変異体を用いて, *ses* 変異体の原因遺伝子の相補性検定と詳細な *ses* 変異体の解析, そして *SES* の機能解析について記述する。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試植物および栽培方法

トマトの矮性品種であるマイクロトム (*Solanum lycopersicum* ‘Micro-Tom’) の野生株 (図 I) とガンマ線照射によって作出された雌雄不稔性を示す *sexual sterility* (*ses*) 変異体および *ses2* 変異体を用いた.

栽培方法は第 1 章と同様.

2.2.2 トマトゲノム DNA の抽出

第 1 章参照.

2.2.3 形質転換用コンストラクトの構築

2.2.3.1 遺伝子過剰発現 (Over expression (OX)) コンストラクトの構築

OX コンストラクトの構築は基本的に第 1 章の 1.2.3.2 の手順に準じて行った. *SES* 遺伝子をクローニングするために, 翻訳開始コドンから終始コドンまでを増幅させるプライマー SES-OX-Fw および Rv (表 2-1) を用いて, つばみ由来の cDNA (10 ng/μl) をテンプレートに表 1-2 の条件で PCR を行った. アニール温度は 55°C, 伸長時間は 1 分とした. 続いて, PCR 産物にアデニンを付加し, ゲル抽出した後, pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) に TA クローニングにより導入した. 大腸菌 (DH5α 株) にプラスミド導入後, コロニー PCR を行った. プライマーはエントリーベクター内の配列である M13-Fw と M13-Rv もしくはクローニングに用いた SES-OX-Rv プライマー (表 2-1) を用い, 表 2-2 の条件で PCR を行った. 次に, プラスミドの導入が確認されたコロニーより, プラスミドを抽出し, シーケンスにて標的配列を確認した. 正しく標的配列が導入されたプラスミドを選抜し, LR 反応によりディステーションベクターに導入した. ディステーションベクターは 35S プロモーターによる過剰発現を誘導する pBI-OX-GW (INPLANTA INNOVATIONS) を用いた. そして, 大腸菌 (DH5α 株) に正しくバイナリーベクターが導入されたか確認するために, コロニー PCR を行った. クローニングの際に用いたプライマー SES-OX-Fw および Rv (表 2-1) で表 2-2 の条件で PCR を行った. さらに, 抽出したプラスミドをテンプレートにプライマー 35S-promoter-Fw と SES-OX-Rv を用いて表 1-2 の条件で再度 PCR を行い, 電気泳動でバンドのサイズを確認した. アニール温度は 55°C, 伸長時間は 2 分とした. 続いて, 正しくバンドが確認されたプラ

スミドの標的配列をシーケンス解析にて確認した。その際、プライマーは SES-Seq-Fw, SES-Seq-Rv 1, SES-Seq-Rv 2 そして SES-OX-Rv の 4 種類 (表 2-1) を用いた。ここで構築されたコンストラクトを〈SES-OX〉とした (図 2-1B, 2-2A)。

2.2.3.2 遺伝子発現抑制 (RNAi) コンストラクトの構築

RNAi コンストラクトの構築は基本的に第 1 章の 1.2.3.2 の手順に準じて行った。SES 遺伝子の標的配列をクローニングするために、プライマー SES-RNAi-Fw および Rv (表 2-1) を用いて表 1-2 の条件で PCR を行った。アニーリング温度は 55℃, 伸長時間は 1 分とした。続いて、PCR 産物にアデニンを付加し、ゲル抽出した後、pCR8/GW/TOPO (Invitrogen) に TA クローニングにより導入した。大腸菌 (DH5α 株) にプラスミド導入後、コロニーPCR を行った。プライマーはエントリーベクター内の配列である M13-Fw と M13-Rv もしくはクローニングに用いた SES-RNAi-Rv プライマー (表 2-1) を用い、表 2-2 の条件で PCR を行った。次に、プラスミドの導入が確認されたコロニーより、プラスミドを抽出し、シーケンスにて標的配列を確認した。正しく標的配列が導入されたプラスミドを選抜し、LR 反応によりディステーションベクターに導入した。ディステーションベクターは pANDA35HK vector (図 2) を用いた。そして、大腸菌 (DH5α 株) に正しくバイナリーベクターが導入されたか確認するために、コロニーPCR を行った。プライマーは gus-linker-Fw または gus-linker-Rv と SES-RNAi-Rv プライマーを用いて (表 2-1), 表 1-3 に示した条件で PCR を行った。続いて、正しくバンドが確認されたプラスミドの標的配列をシーケンス解析にて確認した。その際、プライマーは gus-linker 配列を認識するプライマー gus-linker-Fw および Rv を使用した (表 2-1)。ここで構築されたコンストラクトを〈SES-RNAi〉とした (図 2-1B, 2-2B)。

2.2.3.3 遺伝子全長導入コンストラクトの構築

遺伝子全長導入コンストラクトの構築は基本的に第 1 章の 1.2.3.3 の手順に準じて行った。初めに、SES のプロモーター領域 (2563 bp) からターミネーター領域 (763 bp) を含む全 4636 bp のクローニングを行った。In-Fusion 用のプライマー SES-Promoter-Fw および SES-Terminator-Rv (表 2-1) を用いて、WT のゲノム DNA をテンプレートに表 1-2 に示した条件で PCR を行った。アニーリング温度は 57℃, 伸長時間は 3 分とした。その後、PCR 産物にはエンハンサーを付加した。次に、バイナリーベクター (pBI121hm) に制限

酵素 *Hind* III と *Sal* I を 37℃で一晩処理した (表 2-3). さらに, サーマルサイクラーを用いて 80℃で 20 分間処理し, 制限酵素を失活させた. そして, PCR フラグメントと直鎖状のバイナリーベクターを表 1-8 の組成で調製し, In-Fusion を行った. 続いて, 大腸菌コンピテントセル (DH5 α) に導入し, あらわれたコロニーに対してコロニーPCR を行った. コロニーPCR は *SES* 遺伝子上の一部を増幅するプライマーSES-Check-Fw および Rv (表 2-1) を用いて表 1-3 の条件で行った. さらに, 選抜されたコロニーからプラスミドを抽出してシーケンス解析を行い, 正しく標的配列が導入されているプラスミドベクターを選抜した. その際, プライマーは pIG121hm-Fw1 と pIG121hm-Rv4 (表 1-1, 2-1) を用いた. ここで構築した *SES* のプロモーターからターミネーターまで含むコンストラクトを〈SES-Whole Genome〉とした (図 2-1A, 2-2C).

2.2.3.4 GUS 発現形質転換コンストラクトの構築

GUS 発現コンストラクトの構築は基本的に第 1 章の 1.2.3.3 の手順に準じて行った. 初めに, *SES* のプロモーター領域 (2563 bp) をクローニングするために In-Fusion 用のプライマーSES-Promoter-Fw および Rv (表 2-1) を用いて表 1-2 に示した条件で PCR を行った. アニーリング温度は 57℃, 伸長時間は 1 分 30 秒とした. その後, PCR 産物にはエンハンサーを付加した. 次に, バイナリーベクター (pBI121hm) に制限酵素 *Hind* III と *Xba* I を 37℃で一晩処理した (表 1-7). さらに, サーマルサイクラーを用いて 80℃で 20 分間処理し, 制限酵素を失活させた. そして, PCR フラグメントと直鎖状のバイナリーベクターを表 1-8 の組成で調整し, In-Fusion を行った. 続いて, 大腸菌コンピテントセル (DH5 α) に導入し, あらわれたコロニーに対してコロニーPCR を行った. コロニーPCR は *SES* のプロモーターの一部を増幅するプライマーSES-Check-Fw2 および Rv2 (表 2-1) を用いて表 1-3 の条件で行った. さらに, 選抜されたコロニーからプラスミドを抽出してシーケンス解析を行い, 正しく標的配列が導入されているプラスミドベクターを選抜した. その際, プライマーは pIG121hm-Fw1 と pIG121hm-Rv1 (表 1-1) を用いた. ここまでで構築された *SES* のプロモーター領域が導入されたコンストラクトを〈SES_{Sp}-GUS〉とした (図 2-1A, 2-2D).

上記で構築された〈SES_{Sp}-GUS〉にさらに, *SES* のターミネーター領域を導入するために, *SES* のターミネーター領域 (763 bp) のクローニングを行った. プライマーは SES-Terminator-Fw および Rv2 (表 2-1) を用いて, 表 1-9 の条件で PCR した. 次に, ゲル

抽出した PCR 産物と *Sac* I 処理により直鎖状にした〈*SESp*-GUS〉を用いて、表 1-8 に示した組成で In-Fusion 反応を行った。続いて、大腸菌コンピテントセル (DH5 α) に導入し、あらわれたコロニーに対してコロニーPCR を行った。コロニーPCR はプライマー SES-Terminator-Fw および pIG121hm-Rv2 (表 1-1, 2-1) を用いて表 1-3 の条件で行った。さらに、選抜されたコロニーからプラスミドを抽出してシーケンス解析を行い、正しく標的配列が導入されているプラスミドベクターを選抜した。その際、プライマーは pIG121Hm-Fw2 および Rv3 を用いた (表 1-1)。ここで構築された *SES* のプロモーター領域およびターミネーター領域が導入されたコンストラクトを〈*SESpt*-GUS〉とした (図 2-1A, 2-2D)。

2.2.3.5 FCC2 および TCP29 に RAR モチーフを結合させたコンストラクトの構築

FCC2 および *TEOSINTE BRANCHEDI/CYCLOIDEA/PCF29* (*TCP29*) に *SES* 由来の EAR モチーフを結合させたコンストラクトを構築した。初めに、*SES* のプロモーター、ターミネーターおよび EAR モチーフを持つバイナリーベクターの外骨格を作製するために、プライマー SESall-EAR motif-Fw と SESall-Promoter-Rv (表 2-1) を用いて、〈*SES*-Whole genome〉コンストラクトのプラスミドベクターをテンプレートに表 2-4 に示した条件で Inverted PCR を行った。その PCR 産物に *Dpn* I を加えて (表 2-5)、37°C で 1 時間インキュベートし、大腸菌由来のプラスミド DNA を消化した。さらに、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて、付属のプロトコールに従い PCR 産物を精製した。次に、挿入するフラグメント *FCC2* および *TCP29* を増幅するために、表 1-2 の条件で PCR を行った。プライマーは *FCC2* フラグメント増幅に FCC2-EAR motif-Fw および Rv, *TCP29* フラグメント増幅に TCP29-EAR motif-Fw および Rv (表 2-1) を用いた。アニーリング温度は *FCC2* フラグメント増幅時 60°C, *TCP29* フラグメント増幅時 56.7°C, 伸長時間は共に 1 分とした。PCR 産物をゲル抽出した後、バイナリーベクターと組み合わせて、表 1-8 の反応液を調製し、In-Fusion 反応を行った。続いて、大腸菌コンピテントセル (DH5 α) に導入し、あらわれたコロニーに対してコロニーPCR を行った。コロニーPCR は *FCC2* または *TCP29* の CDS の途中から *SES* の終始コドンまでを増幅する FCC2-CDS-Fw または TCP29-CDS-Fw と SES-OX-Rv (表 2-1) を用いて表 1-3 の条件で行った。さらに、選抜されたコロニーからプラスミドを抽出してシーケンス解析を行い、正しく標的配列が導入されているプラスミドベクターを選抜した。その際、プライマー

は SES-for seq-Fw および SES-OX-Rv を用いた (表 2-1). ここで構築された *FCC2* の CDS が導入されたコンストラクトを〈*SESpt-FCC2-EAR*〉とし, *TCP29* が導入されたコンストラクトを〈*SESpt-TCP29-EAR*〉とした (図 2-1A, 2-2E).

2.2.4 アグロバクテリウム法によるトマトへの形質転換

第 1 章参照.

ただし, 〈*SES-Whole Genome*〉と〈*SESpt-FCC2-EAR*〉および〈*SESpt-TCP29-EAR*〉は WT の子葉の他に, *ses* ヘテロ株から採種した種子を播種し, 得られた子葉にアグロバクテリウムを感染させた.

2.2.5 フローサイトメーターを用いた倍数性の確認

第 1 章参照.

2.2.6 導入遺伝子の確認とそのコピー数の調査

第 1 章参照.

2.2.7 形質転換体 T1 世代におけるホモザイガス, ヘテロザイガス, アザイガスの選抜

第 1 章参照.

2.2.8 *ses* および *ses2* 変異体識別 DNA マーカーによる変異体の選抜

2.2.8.1 *ses* 変異体を識別する DNA マーカーの作製とそれを用いた変異体の選抜

SES 全長導入組換え個体の作出により, これまで使用していた DNA マーカーでの選抜が不可能になったため, 新しい DNA マーカーを作製した. 初めに, WT と *ses* 変異体の *SES* 遺伝子を比較し, [Genetyx ver.11] を用いて 2 つのゲノムを差別化できる制限酵素を選抜した. 次に, 〈*SES-Whole genome*〉コンストラクトは増幅せず, 内在の *SES* 遺伝子を増幅できるプライマーセットを作製した.

内在の *SES* 遺伝子およびその変異部位を増幅するプライマー-*SES-markaer* を用いて (表 2-6), 表 2-7AB の条件で PCR を行った. 続いて, PCR 産物に制限酵素 *Bsl* I を表 2-7C に示した組成で加えて, 55°C で 6 時間以上インキュベートした. そして, 2% アガロースゲルで制限酵素処理後 PCR 産物を泳動して, バンドパターンの違いで, *ses* 変異体の選

抜を行った。

2.2.8.2 *ses2* 変異体識別マーカーの作製とそれを用いた変異体の選抜

NBRP トマト ‘Micro-Tom’ 変異体集団より単離された *ses2* 変異体において *SES* 遺伝子上の変異の有無を識別する DNA マーカーを作製した。

1) *SES* 遺伝子のシーケンス解析

初めに、プライマーSES-Marker (Forward, 表 2-6) と SES-Terminator-Rv2 (表 2-1) の組み合わせで、表 1-2 の条件で PCR を行った。アニーリング温度は 55°C、伸長時間は 1 分 20 秒とした。次に、その PCR 産物を 1%ゲルで電気泳動を行い、バンドをゲル抽出した。そして、ゲル抽出 DNA を用いて表 1-4 で示した条件でシーケンシング解析を行った (プラスミドの代わりにゲル抽出 DNA をテンプレートとした)。その際、プライマーは SES-Seq-Fw, SES-Seq-Fw2, SES-Seq-Fw3 そして SES-Seq-Fw4 の 4 種類を用いた (表 2-1)。シーケンスデータは [Genetyx ver.11] で解析し、*ses2* 変異体の持つ変異を単離した。

2) DNA マーカーの作製とそれを用いた変異体の選抜

DNA マーカーは [dCAPS Finder 2.0 (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>)] を用いて作製した。

ゲノム DNA をテンプレートにプライマーに SES2-Marker を用いて表 2-8AB の条件で PCR を行った。続いて、その PCR 産物に *Taq*I を表 2-8C の組成で加えて、65°C で 6 時間以上インキュベートした。そして、2.5%のアガロースゲルで制限酵素処理後 PCR 産物を泳動して、バンドパターンの違いで、*ses2* 変異体の選抜を行った。

2.2.9 アレリズムテスト

ses 変異体と *ses2* 変異体の原因遺伝子が同一 (*Solyc07g063670*) であるか調査するために、*ses* 変異体と *ses2* 変異体を交配し、交配第一世代 (F₁) の表現型を観察した。その際、*ses* 及び *ses2* 変異体のホモ個体は雌雄不稔性を示すため、DNA マーカー (2.2.8) により変異をヘテロで持つ個体を選抜し、交配親として使用した。

2.2.10 パラフィン切片の作製と光学顕微鏡を用いた観察

第 1 章参照。

2.2.11 GUS 染色

第 1 章参照.

2.2.12 qRT-PCR による遺伝子発現解析

第 1 章参照. 使用したプライマーは表 2-9 にまとめた.

2.2.13 データベースを用いた *SES* および関連遺伝子の解析

SES や関連遺伝子の塩基配列および, アミノ酸配列は Sol Genomics Network (SGN; <http://solgenomics.net/>) のサイトを用いて検索した. そして, タンパクに保存されているドメイン検索は National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Conserved Domain Search (CD-Search; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) を利用した. また, シロイヌナズナのコモログ遺伝子 SPL/NZZ とのタンパク配列の比較には, The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) の EMBOSS Needle (Pairwise Sequence Alignment; http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/) を用いて解析した. そして, TomExpress (<http://gbf.toulouse.inra.fr/tomexpress/www/welcomeTomExpress.php>) を用いて, *SES* と他の遺伝子の共発現解析を行った.

2.3 結果

2.3.1 公共データベースを利用した *SES* 遺伝子の解析

2.3.1.1 *SES* タンパク質の持つモチーフの探索

SES タンパク質のシロイヌナズナにおけるホモログタンパク質 SPL/NZZ は、その C 末端側に EAR モチーフ (LxLxL; Kagale and Rozwadowski 2011) を持つことが明らかになっている (Chen et al. 2014; Wei et al. 2015). トマト *SES* にも EAR モチーフがあるか確かめたところ、*SES* タンパク質の C 末端 345-351 a.a. に EAR モチーフが確認された (図 2-3). また、ドメイン検索を行ったところ、29-215 a.a. に [Plant transcription factor NOZZLE] が保存されていた (NCBI, Conserved Domain Search; 解析日 2016.11.08; 図 2-3A).

2.3.1.2 プロモーターおよびターミネーター領域の転写因子認識配列の探索

続いて、*SES* の転写開始点より上流 5000 bp と転写終了点より下流 2000 bp に存在する AG の結合配列を検索した. その結果、*SES* にはその上流のアンチセンス鎖に 1 か所と下流のセンス鎖に 1 か所の AG 結合配列が存在した (図 2-4).

2.3.2 *ses* 変異体の形態学的解析

2.3.2.1 開花期における花器官の観察

ses 変異体の開花期における雌蕊と葯の観察を行った (図 2-5). 初めに、*ses* 変異体の開花期の花器を観察したところ、先行研究 (羽尾, 修士論文 2014) と同様に *ses* 変異体は萎れた葯を形成した (図 2-5A). 次に、*ses* 変異体の子房の大きさを WT と比較したところ、WT の子房は横径が 1.28 mm, 縦径が 1.41 mm であったのに対し、*ses* 変異体の子房は横径が 1.05 mm, 縦径が 1.29 mm であった (図 2-5B, C). 横径, 縦径とも *ses* 変異体が有意に小さかった. 続いて、開花期葯の横断切片を作製し、光学顕微鏡で観察した. その結果、WT は 1 つの葯につき、維管束を中心に 4 つの葯室を形成し、その中には花粉が確認された. 一方、*ses* 変異体は葯室および花粉を形成せず、維管束と外皮のみ確認された (図 2-5D).

2.3.2.2 発達段階別雌蕊および葯の観察

次に, *ses* 変異体における胚珠および葯の発達を観察するために, つぼみの発達段階別でステージ分けし (縦径 1-2, 2-3, 4-5, 6-7 mm), 切片を作製した. 葯の横断切片の観察を行ったところ, WT では 1-2 mm のつぼみの段階で維管束の周りに 4 つの葯室が確認でき, その中には花粉母細胞 (PMC, pollen mother cell) が形成されていた. 2-3 mm のつぼみにおいて, 葯ではタペート組織 (T, tapetum) と減数分裂細胞 (MC, meiotic cell) が確認され, 4-5 mm のつぼみではタペート組織は分解が進んでいた. さらに, 4-5 mm のつぼみになるまでに花粉母細胞は減数分裂を行い小孢子 (Msp, microspore) を形成した. 6-7 mm のつぼみでは成熟した花粉が確認された (図 2-6A). 一方, *ses* 変異体は全てのステージにおいて, 維管束と表皮は確認されたが, その他の組織の発達は確認されなかった (図 2-6A).

続いて, 発達段階別の子房の横断切片を観察した. 1-2 mm のつぼみの子房内では WT および *ses* 変異体共に胎座より胚珠原基 (OP, ovule primordia) が形成されていた (図 2-6B). WT は 2-3 mm のつぼみの時点ではっきりとした大孢子母細胞 (MMC, megaspore mother cell) が観察され, さらにそれを囲う様に珠皮 (OI, ovule integument) が形成されていた. 4-5 mm のステージでは, 珠皮が完全に大孢子母細胞 (珠心) を囲んでおり, その後開花期まで大きな変化は見られなかった (図 2-6C). 一方, *ses* 変異体は 2-3 mm のつぼみにおいて, 明確な大孢子母細胞やそれを囲う珠皮は形成されなかった. その後の 4-5 mm, 6-7 mm のつぼみにおいても胚珠の発達は確認されず, 湾曲した未熟な胚珠を形成した (図 2-6B, C).

2.3.3 *ses2* 変異体 (e0417) の解析

筑波大学が保持するトマト ‘Micro-Tom’ 変異体集団の EMS 処理個体から, *ses* 変異体様の表現型を示す個体 *ses2* 変異体を単離し解析した.

2.3.3.1 形態学的解析

ses2 変異体は *ses* 変異体同様に萎れた葯を形成し, その中に花粉は確認されなかった (図 2-7A). さらに, WT の花粉を *ses2* 変異体のめしべに受粉させても種子の入った果実は形成しなかった. これらの結果から *ses2* 変異体は *ses* 変異体同様, 両性不稔性を持つことが分かった. そして, 花粉を形成しないにも関わらず, 果実を形成した (図 2-7B). その果実の中には種子は形成されていなかった.

2.3.3.2 *SES* 遺伝子のシーケンス解析

ses2 変異体が *ses* 変異体と同じ表現型を示したため、*ses* 変異体の原因遺伝子候補である *SES* (*Solyc07g063670*) 内に変異を持つかどうかシーケンス解析を行った。その結果、*ses2* 変異体で *SES* の第一エキソン内 (翻訳開始の塩基から数えて 475 番目) に C (シトシン) から T (チミン) への塩基置換がみられた。また、その塩基置換によりアミノ酸のグルタミン (Gln) がストップコドンへと変化した (ナンセンス変異)、翻訳が途中で止まっていることが分かった (353 a.a. から 156 a.a.; 図 2-7C)。

2.3.3.3 アレリズムテスト

次に、*ses* 変異体と *ses2* 変異体の原因遺伝子が同一であることを確かめるために、アレリズムテストを行った。どちらの変異体も変異をホモで持つと両性不稔性を示すことから、変異をヘテロで持つ個体を DNA マーカーで選抜し、交配を行った。その F₁ 世代の表現型を観察した結果、分離比が *ses* 型 : WT 型 = 4 : 15 になった (表 2-10)。さらに、それら F₁ 個体の遺伝子型を調査した結果、*ses* 型を示した個体は *ses* 変異と *ses2* 変異を同時に保持し、WT 型を示した個体はどちらか一方の変異を持つかどうかどちらの変異も持っていなかった (表 2-10, 図 2-8)。

2.3.4 遺伝子発現抑制体の解析

2.3.4.1 *SES* 発現抑制組換え体の作出

構築したコンストラクトされた〈*SES*-RNAi〉 (図 2-2B) はアグロバクテリウムを介してトマト ‘Micro-Tom’ に遺伝子導入した。その結果、*SES* 遺伝子の抑制組換え体 (以下 *SES*-RNAi 組換え体) の T0 個体を 64 個体獲得した。その中から、ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて、サザンブロット解析を行った。サザンブロット解析により、*SES*-RNAi 組換え T0 個体は 36 系統 (内シングルコピー 15 系統) に分けることができた (図 2-9)。

2.3.4.2 *SES*-RNAi 組換え体の解析

組換え T0 個体を観察したところ、草姿に目立った変異はなく、開花期の花器も WT と比べて大きな変化は見られなかったが、組換え体の中には葯から花柱が飛び出る表

現型を示す個体もあった (図 2-10A, B). 組換え個体の葯の中には稔性のある花粉が形成されており, 果実および種子も WT と同様に形成することができた (図 2-10A, C). 次に, 開花期の花器の切片を作製し, 胚珠および花粉, 葯の観察を行った. その結果, *SES*-RNAi 組換え個体は正常に胚珠を形成することが分かった (図 2-11A). また, WT では 1 つの葯に 4 個の葯室ができるが, *SES*-RNAi 組換え体でそれが崩れ, 葯室が 2-3 個になっていた. さらに崩壊が進んでいた葯の葯室には花粉が観察されなかった (図 2-11B).

続いて, T1 世代へと進める系統を選抜するために, 組換え T0 個体の果実特性として果実重, 子室数, 種子数を調査した (図 2-12). シングルコピーでかつ果実重が軽く, 1 果実あたりの種子数が少ない系統である #14, #38, #49 の 3 系統を後代へと進めた (ここで十分な種子数が確保できなかったものは除外した). そして, T1 世代における果実特性 (果実重, 果実サイズ, 子室数, 種子数) を, 導入遺伝子をホモで持つ系統と導入遺伝子を持たないアザイガス (AZ) 個体と比較した. 調査した結果, 調査項目すべてでホモザイガス (HO) 系統の方が減少する傾向にあった (図 2-13). また, #14 系統では果実重, 果実サイズ, 種子数に有意差がみられた (図 2-12A, B, C, E). また, *ses* 変異体が両性不稔性を示すことから, T1 個体より採種された種子の発芽能力を調査した. 著しく発芽率が減少する系統はなかったが, AZ 個体に比べて HO 個体は発芽しない割合が高くなった (図 2-14).

続いて, *SES*-RNAi 組換え体において *SES* の発現が目的通りに抑制できているかどうかを確認するために, T2 世代の組換え体を用いて, *SES* が高発現する早いステージのつぼみ (縦径 1 mm 以下) 全体から cDNA を合成し, 発現解析を行った. その結果, HO 個体では WT および AZ 個体と比べて有意に *SES* の発現量が減少していた (図 2-15).

2.3.5 遺伝子全長導入組換え体の解析

2.3.5.1 遺伝子全長導入組換え体の作出

構築したコンストラクト 〈*SES*-Whole Genome〉 (図 2-2C) はアグロバクテリウムを介してトマト ‘Micro-Tom’ の WT と *ses* ヘテロ株の次世代に遺伝子導入した. その結果, *SES* 遺伝子全長導入組換え体 (以下 *SES*-Whole 組換え体) の T0 個体を 20 個体獲得した (*ses* ヘテロ株由来 17 個体, WT 由来 3 個体). その中から, ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて, サザンブロット解

析を行った。サザンブロット解析により、*SES-Whole* 組換え体 T0 個体は 10 系統 (内シングルコピー5 系統) に分けることができた (図 2-16A)。そして、*ses* ヘテロ株由来の系統に関しては DNA マーカーを用いて *ses* の遺伝子型を確かめた。9 系統中 6 系統が変異型 (M), 2 系統がヘテロザイガス型 (H), 1 系統が WT 型 (W) であった (図 2-16B)。

2.3.5.2 *SES-Whole* 組換え体の解析

T0 世代において、遺伝子型が *ses* 変異型を示した系統のうち #2 と #7 は開花期に膨らみのある蒴を形成し、その中には花粉が確認された (図 2-17)。さらに、野生株同様に発芽能力のある種子を形成した。続いて、組換え T1 世代でさらに詳しく表現型を解析するために、#2 系統および、組換え T0 世代で遺伝子型がヘテロ型を示した #3 と #10 系統から得られた種子を播種し、次世代 (T1 世代) を作出した。作出された個体からゲノム DNA を抽出し、DNA マーカーを用いて導入遺伝子 (*SES-Whole Genome*) を持ち、かつ *ses* 変異をホモで持つ個体を選抜した (図 2-18)。選抜した個体を観察したところ、すべての系統で膨れた蒴を形成し、その中には花粉が確認された (図 2-19AB)。また、開花期の蒴および子房の横断切片を作製し観察した。AZ 個体の蒴は *ses* 変異体同様、蒴室および花粉は観察されず、胚珠は未成熟であった (図 2-19CD)。一方、導入遺伝子を持つ系統 (#2, #3, #10) は蒴室および花粉を形成し、子房内には成熟した胚珠も確認された (図 2-19CD)。続いて果実を観察した結果、導入遺伝子が抜け落ちた AZ 個体は果実を安定的に形成しなかった。一方、遺伝子が導入された系統 (#2, #3, #10) は安定的に着果し、その中に種なし果実は見つからなかった (図 2-20A, E)。そして、果実重、果実横径、縦径、子室数、種子数を計測したところ、遺伝子導入個体は全ての計測項目が *ses* 変異体より増加していた。しかし、果実重、果実横径、子室数、種子数は WT よりも小さかった (図 2-20B-E)。

2.3.6 遺伝子過剰発現体の解析

構築したコンストラクト 〈*SES-OX*〉 (図 2-2A) はアグロバクテリウムを介してトマト ‘Micro-Tom’ の WT に遺伝子導入した。224 枚の子葉切片に感染させた結果、16 系統のカルスと、6 個体の *SES* 遺伝子過剰発現組換え体 (以下 *SES-OX* 組換え体) T0 個体を獲得した。しかし、その T0 個体よりゲノム DNA を抽出し、導入遺伝子の有無を確認したところ、導入遺伝子を持つ個体は得られなかった (表 2-11)。

2.3.7 GUS 染色

2.3.7.1 GUS 発現組換え個体の作出

GUS 発現組換え個体を作成するために構築された2つのコンストラクト〈SESp-GUS〉(SES プロモーターのみ導入) と〈SESpt-GUS〉(FCC2 プロモーターおよびターミネーターを導入) (図 2-2D) はそれぞれアグロバクテリウムを介してトマト ‘Micro-Tom’ に遺伝子導入した。その結果、前者の GUS 発現組換え体 (以下 SESp-GUS 組換え体) の T0 個体を 30 個体獲得した。その中から、ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて、サザンブロット解析を行った結果、21 系統 (内シングルコピー5 系統) の SESp-GUS 組換え体に分けることができた (図 2-21A)。また、後者の GUS 発現組換え体 (以下 SESpt-GUS 組換え体) においては、T0 個体を 18 個体獲得した。その中から、ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて、サザンブロット解析を行った。それにより、SESpt-GUS 組換え体 T0 個体は 11 系統 (内シングルコピー8 系統) に分けることができた (図 2-21B)。

2.3.7.2 GUS 染色

初めに、SESp-GUS および SESpt-GUS 組換え体の幼苗の GUS 染色を行った。その結果、SESp-GUS 組換え体の染色したすべての系統 (#22, #23, #28) において、子葉の葉脈、胚軸の維管束および幼根で GUS の呈色が確認された (図 2-22A)。一方、SESpt-GUS 組換え系統の #1 と #17 で胚軸と幼根の境目の維管束でわずかに GUS の呈色がみられたが #7 系統では呈色されなかった (図 2-22B)。次に、成熟葉および未熟葉の染色を行った。その結果、SESp-GUS, SESpt-GUS 組換え体共に GUS の呈色は確認されなかった (図 2-23AB)。続いて、発達段階別のつぼみおよび開花期の花器の GUS 染色を行った。その結果、SESpt-GUS 組換え体では縦径 2-3 mm および 3-4 mm のつぼみの胚珠で GUS の呈色が確認された。さらに、光学顕微鏡で詳細に観察すると、その呈色は胚珠の珠心のみで見られることが分かった (図 2-24C)。

2.3.8 qRT-PCR

2.3.8.1 SES の遺伝子発現

まず初めに発達段階別の雌蕊 (縦径 3 mm, 4.5 mm, 6 mm, 開花 1 日前, 開花日のつぼみよりサンプリング) および縦径 1 mm 以下のつぼみ全体での *SES* の発現レベルを調査した. その結果, WT では 1 mm 以下のつぼみで高発現し, 雌蕊のステージ別では早いステージほど高発現していた (図 2-25A). また, *ses* 変異体においては, 野生株で *SES* の発現が確認された全てのステージにおいて *SES* の発現が有意に減少していた (図 2-25B).

2.3.8.2 葯および花粉形成に関与する遺伝子の発現

次に, 葯および花粉形成に関与する遺伝子の発現を, 1 mm のつぼみより合成した cDNA を用いて調査した. その結果, トマトにおいて葯のタペート組織の形成や花粉母細胞の減数分裂に重要な遺伝子である *Male Sterile 10³⁵* (*MS10³⁵*, Jeong et al., 2014) の遺伝子発現量が 1 mm のつぼみにおいて優位に減少していた (図 2-26A). そして, シロイヌナズナにおいて葯の骨格 (花粉母細胞を囲う組織) の初期形成に重要な遺伝子である *BARELY ANY MERISTEM1* および 2 (*BAM1/2*) (Hord et al., 2006) とタペート組織と中間層の形成に必要な遺伝子である *EXCESS MICROSPOROCYTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS* (*EMS1/EXS*) (Zhao et al., 2002) のオーソログ遺伝子をトマトで BLAST 検索し, その遺伝子の発現量を測定した. その結果, *BAM1/2-like^a* (*Solyc02g091840*) の発現は有意に減少し, *BAM1/2-like^b* (*Solyc01g103530*) の発現レベルには変化がみられなかった (図 2-26B, C). また, *EMS1/EXS-like^a* (*Solyc09g098420*) の発現レベルは *ses* 変異体で劇的に減少し, *EMS1/EXS-like^b* (*Solyc03g026040*) の発現レベルはわずかに減少した (図 2-26D, E).

2.3.8.3 胚珠形成に関与する遺伝子の発現

次に, 胚珠の形態形成に関与する遺伝子の発現解析を行った. シロイヌナズナにおいて胚珠形成に重要な役割を持つ遺伝子 *WUSCHEL* (*WUS*) と *INNER NO OUTER* (*INO*) のオーソログ遺伝子である *SIWUS* (*Solyc02g083950*) と *SIINO* (*Solyc05g005240*) の遺伝子発現レベルは, WT で発現が確認されるすべてのステージで劇的に減少していた (図 2-27A, B). また, *WUS*, *INO* 同様にシロイヌナズナにおいて胚珠形成に重要な遺伝子である *AINTEGUMENTA* (*ANT*), *PIN-FORMED1* (*PIN1*), *BELL1* (*BEL1*), *REVOLUTA* (*REV*), *CORONA* (*CNA*) および *PHABULOSA/PHAVOLUTA* (*PHB/PHV*) のオーソログ遺伝子をトマトで BLAST 検索し, その遺伝子の発現量を測定した. その結果, *ANT-like* (*Solyc04g077490*), *PIN1* (*Solyc03g118740*), *BEL1-like* (*Solyc08g081400*), *SIREV*

(*Solyc11g069470*), *CNA-like* (*Solyc03g120910*), *PHB/PHV-like* (*Solyc02g124070*) の発現量は全て 4.5 mm のつぼみの雌蕊で有意に減少していた。 *ANT-like*, *SIREV*, *CNA-like* は開花期の雌蕊でも減少がみられた (図 2-27C-H)。そして, *GOBLET* (*GOB*; *Solyc07g062840*) の発現量は 1 mm のつぼみと 4.5 mm のつぼみの雌蕊で有意に減少した (図 2-27I)。

2.3.8.4 心皮の形成と果実肥大性に関与する遺伝子の発現

続いて、心皮の形成と果実肥大性に関与する遺伝子の発現解析を行った。花芽形成の ABC モデルにおいて心皮の形成を制御している C クラス遺伝子の *TAG1* (*Solyc02g071730*) の発現量は 4.5 mm のつぼみと開花期の雌蕊で有意に減少した (図 2-28A)。 *TAG1* の相同遺伝子である *TAG-like1* (*TAGL1*) の遺伝子発現パターンは *TAG1* に似ており、1 mm のつぼみにおける発現量がわずかに減少していた (図 2-28B)。そして、花芽分裂組織の大きさと心皮の形成枚数を制御している *CLV1/FAB*, *CLV2*, *FIN/HPAT3* の遺伝子発現は、1 mm のつぼみと 4.5 mm のつぼみから採取した雌蕊で有意に減少していた (図 2-28D, E, G)。また, *CLE3* の発現は 4.5 mm のつぼみから採取した雌蕊のみで減少し, *FAS* の発現量に有意差はみられなかった (図 2-28C, F)。また, *FAS*, *CLV1/FAB*, *CLV2*, *CLE3*, *FIN/HPAT3* は形成初期のつぼみで高発現し、次第に減少する傾向がみられた (図 2-28C-G)。そして、果実肥大性に最も影響のある *FW2.2* の発現レベルは WT において 1 mm, 4.5 mm, Anthesis と次第に減少したが, *ses* 変異体では開花期に発現が有意に増加した。 *FW3.2* の発現は主に 1 mm のつぼみで確認され, *ses* 変異体における発現レベルは WT に比べて半減していた。また、花芽分裂組織の大きさを決定している遺伝子である *CLV3* の発現は、観察したステージでは確認されなかった。

2.3.9 EAR モチーフ接続組換え体の解析

2.3.9.1 EAR モチーフを接続させる遺伝子の選抜

シロイヌナズナの *SPL/NZZ* は転写因子である *CINCINNATA* (*CIN*) -like TCP family および *YABBY* family と結合すると報告されている (Sieber et al., 2004; Chen et al., 2014; Wei et al., 2015)。そこで、トマトで報告されている *CIN*-TCP family (Parapunova et al., 2014) と *YABBY* family (Huang et al., 2013; Han et al., 2015) に絞って、4.5 mm のつぼみの雌蕊と開花期の雌蕊で行われた RNA シーケンスのデータより各遺伝子の発現量を比較した。その結果、TCP family の中では *TCP24* と *TCP29* が高い発現量を示し、*YABBY*

family の中では *CRCb*, *YAB1a*, *YAB1b*, *YAB2a*, *YAB5a* が高い発現量を示した (図 2-29AB). また, TomExpress を用いて, *SES* との共発現性を調べたところ, *TCP29* は *SES* 発現の強弱によって発現が変動する遺伝子の一つであることが分かった (図 2-29C). これらのデータより, CIN-TCP family の候補遺伝子は *TCP29* に決定した. 一方, YABBY family の中からは第一章で単離した遺伝子 *FCC2* のさらなる知見になると考え, *FCC2* を候補遺伝子とした.

2.3.9.2 EAR モチーフ接続組換え体の作出

EAR モチーフ接続組換え体を作成するために構築された 2 つのコンストラクト〈*SESpt-FCC2-EAR*〉と〈*SESpt-TCP29-EAR*〉(図 2-2E) はそれぞれアグロバクテリウムを介してトマト ‘Micro-Tom’ の *ses* 変異体ヘテロ株の次世代に遺伝子導入した. その結果, 前者の組換え体 (以下 *SESpt-FCC2-EAR* 組換え体) の T0 個体を 10 個体獲得した. その中から, ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて, サザンブロット解析を行った結果, 7 系統 (内シングルコピー 5 系統, #4 系統はバンドが確認できなかった) の *SESpt-FCC2-EAR* 組換え体に分けることができた (図 2-30A). また, 後者の組換え体 (以下 *SESpt-TCP29-EAR* 組換え体) においては, T0 個体を 26 個体獲得した. その中から, ゲノム DNA の抽出ができたものおよび PCR により導入遺伝子の導入が確認できたものにおいて, サザンブロット解析を行った. それにより, *SESpt-TCP29-EAR* 組換え体 T0 個体は 11 系統 (内シングルコピー 1 系統) に分けることができた (図 2-30B). 続いて, *ses* の遺伝子型を判別する DNA マーカーを用いて, 得られた組換え T0 個体の遺伝子型を調査した. その結果, *SESpt-FCC2-EAR* 組換え個体では 1 系統の変異型 (M), 3 系統のヘテロザイガス型 (H), 3 系統の WT 型 (W) が得られた. そして, *SESpt-TCP29-EAR* 組換え個体では 4 系統の変異型 (M), 7 系統のヘテロザイガス型 (H) が得られ, WT 型 (W) は得られなかった (図 2-30C).

2.3.9.3 EAR モチーフ接続組換え体の解析

SESpt-FCC2-EAR 組換え T0 個体および *SESpt-TCP29-EAR* 組換え T0 個体で, *ses* の遺伝子型が変異型を示した個体の表現型を観察した結果, *ses* 変異体様の表現型を示し, WT 型へ回復した個体はみられなかった. また, T0 世代でヘテロザイガス (H) 型を示した個体の後代 (T1) を作出し, その表現型を観察した. その結果, *SESpt-FCC2-EAR* 組換

え個体, *SESpt-TCP29-EAR* 組換え個体共に *ses* 変異体の表現型を示した (図 2-31). 胚珠および葯の形態も WT 型への回復はみられなかった (図 2-31B-E).

2.4 考察

第2章では *ses* 変異体とその原因遺伝子である *SES* についての解析を行った。先行研究により *ses* 変異体は両性不稔性を示し、その原因遺伝子は単因子劣性であることが分かっている。さらに、‘Ailsa Craig (AC)’ との交配 F₂ 集団を用いたマップベースクローニングおよび、*ses* 変異体の全ゲノムシーケンスにより、*Solyc07g063670* (*SES*) 内の 13 bp の欠失が原因であることが示唆されている (羽尾, 修士論文 2014)。

‘Micro-Tom’ の EMS 変異体集団より、新たに *ses* 変異体と類似した変異を示す *ses2* 変異体が単離され、解析を行った。解析の結果、*ses2* 変異体は *ses* 変異体同様両性不稔性を示し、*Solyc07g063670* 内にナンセンス変異 (ストップコドンを生じる変異) を持つことが分かった (図 2-7C)。さらに、*ses* 変異体と *ses2* 変異体の交配 F₁ 個体 (アレリズムテスト) は2つの変異をヘテロで有する時のみ *ses* 型の表現型を示した (図 2-8)。これらより、*ses* 変異体と *ses2* 変異体の原因遺伝子は同一で、それは *Solyc07g063670* であると強く示唆される。そして、*ses* 変異体の原因遺伝子として単離された遺伝子 *Solyc07g063670* を *SES* とし、遺伝子発現抑制組換え体 (*SES*-RNAi) と *SES* のプロモーター領域からターミネーター領域までを、*ses* 変異体に遺伝子導入する方法 (*SES*-Whole Genome) で相補性検定を行った。その結果、*SES*-RNAi 組換え体では AZ 個体にくらべて縦径 1 mm 以下のつぼみで *SES* の遺伝子発現が減少し、果実サイズが小さくなり、種子数が減少した (図 2-13, 2-15)。また、#34 および #50 系統では開花期葯の構造の崩壊が確認された (図 2-11)。しかし、完全に *ses* 変異体の様に両性不稔性の表現型を示す組換え個体を得ることはできなかった。RNAi 法で期待した結果が得られなかったため、*SES*-Whole 組換え個体において、導入遺伝子を持ち、かつ遺伝子型が *ses* ホモの系統を作出し (図 2-18)、その表現型を観察した。その結果、胚珠および葯の構造は回復し、発芽能力のある種子を持つ果実を形成した (図 2-19, 2-10)。この結果より、*SES* の遺伝子導入で表現型の回復がみられたので、*Solyc07g063670* が *ses* 変異体の原因遺伝子であることが証明された。さらに、シロイヌナズナにおいて *SES* のオーソログ遺伝子である *SPL/NZZ* は、雌性および雄性のどちらの配偶子形成にも重要な遺伝子として報告されており、*SPL/NZZ* の機能欠損体は葯および胚珠の発達に異常がみられる (Schiefthaler et al., 1999; Yang et al., 1999)。*ses* 変異体と *spl/nzz* 変異体が類似した表現型を示していることから、*SES* が原因遺伝子であることが説明できる。また、トマト内にパラログが存在せず (羽尾, 修士論文 2014)、1 つの遺伝子が壊れたことで完全に稔性が失われたことから、*SES* はトマトにおいて雌雄の

配偶子形成を制御している重要な遺伝子であると示唆される。また、変異体集団より単離された 2 つの変異体 (*ses*, *ses2*) が共にストップコドンを生じさせる変異であったことと、RNAi 法による遺伝子発現抑制個体が完全な *ses* 変異を示さず、稔性を維持していたことから、*SES* は少量の発現でもその機能を発揮することができ、胚珠および花粉の形成を誘導すると考えられる。

アミノ酸配列の解析により、*SES* タンパク質はその C 末端に EAR モチーフ (LxLxL; Kagale and Rozwadowski 2011) を持つことが分かった。EAR モチーフを含む抑制ドメイン (RD) 配列を持つタンパク質はそのアミノ酸配列に TOPLESS (TPL) が結合することにより転写抑制因子として働くことが知られている (Kagale and Rozwadowski 2011; Causier et al., 2012)。シロイヌナズナにおける *SES* のオーソログ遺伝子である *SPL/NZZ* もその C 末端に EAR モチーフを持ち、生体内で TPL と複合体を形成し転写抑制因子として働くことが証明されている (Chen et al., 2014; Wei et al., 2015)。さらに、その複合体の形成は雌蕊 (長角果) の発達に必須であることも報告されている (Wei et al., 2015)。また、トマトにおいて RD 配列を持つたんぱく質と TPL との相互作用を示した報告は未だにされていないが、トマトには現在 6 個の *TPL* 遺伝子が存在し、その *TPL* 遺伝子の発現は全身で確認されている (Hao et al., 2014)。よって、トマトにおいても *SES* と *TPL* は結合し、転写抑制因子として働いている可能性が高い。そして、トマトの *SES* やシロイヌナズナの *SPL/NZZ* の他にも EAR モチーフを持つ遺伝子の解析がいくつか報告されている。シロイヌナズナにおいて Cys2/His2-type zinc finger protein に属する遺伝子は EAR モチーフを持ち、その中の *Zat7* および *Zat10* の過剰発現体は塩ストレスや熱ストレス耐性が付与されると報告されている (Mittler et al., 2006; Ciftci-Yilmaz et al., 2007)。また、シロイヌナズナの *DREB and EAR motif protein 1 (DEAR1)* の過剰発現体は矮性の表現型を示し、病害を受けたような細胞死を起こした (Tsutsui et al., 2009)。また、トマトの *Ethylene-responsive transcription factor 36 (SIERF36)* は EAR モチーフを持ち、*SIERF36* をタバコおよびシロイヌナズナで過剰発現させると開花までの時間が短縮され、老化が早まり、気孔密度が減少した。そして、EAR モチーフを除いたものを過剰発現させると気孔密度は減少したが、開花までの時間と老化の早さは WT と同様であった (Upadhyay et al., 2013; 2014)。さらに、*SIERF3* の過剰発現体は生育不全で獲得することができず、EAR モチーフを除いた *SIERF3* の過剰発現体は PR タンパク質の発現上昇を示し、病害耐性が向上した (Pan et al., 2010)。以上の報告より、EAR モチーフを持つ遺伝子は EAR

モチーフの有無によってその機能が異なり、過剰発現体の表現型に違いがみられることが示された。さらに、EAR モチーフを持つ遺伝子の恒常的な発現は植物体の成長を阻害する傾向にあった (Tsutsui et al., 2009; Pan et al., 2010)。本研究においても、*SES* の過剰発現体の作出を試みたが、正常にカルス化した切片の数が少なく、遺伝子の導入が確認された組換え T0 個体の作出には至らなかった (表 2-11)。よって、この結果は実験的な操作の不具合によるものではなく、EAR モチーフを持つ *SES* 遺伝子が恒常的に発現したことによる生育不全が原因であると考えられる。

また、*ses* 変異体のつぼみの発達段階別の切片の観察と発達段階別の発現解析により、*SES* の配偶子形成への役割を明らかにした。シロイヌナズナにおいて *SPL/NZZ* の発現は、ターミネーター領域に”GArG-box [CCNNWWWWGG]”配列を持つことで、*AGAMOUS* (*AG*) によって正に制御されていることが分かっている (Ito et al., 2004)。本研究において、トマトの *SES* もその上流と下流に *AG* の認識配列である”GArG-box”配列を持つことが分かった (図 2-4)。さらに、*SES*Sp-GUS 組換え個体 (プロモーターのみ) と *SES*Spt-GUS 組換え個体 (プロモーターとターミネーター) の GUS 染色を比較すると、*SES*Sp-GUS 組換え個体では幼苗で呈色されたにも関わらず、*SES*Spt-GUS 組換え個体では GUS の呈色がないもしくはわずかであった (図 2-22)。従って、*SES* の遺伝子発現はプロモーター領域だけでなくターミネーター領域でも制御されている可能性が高い。一方、*AG* のオーソログ遺伝子である *TAG1* および *TAGL1* の発現量は、WT に比べて *ses* 変異体の方が低い傾向にあった (図 2-28AB)。また、WT において *TAG1* および *TAGL1* は 4.5 mm つぼみの雌蕊で、*SES* は 1 mm のつぼみで最大の遺伝子発現を示し、異なる発現パターンを示した。よって、*SES* のプロモーターおよびターミネーター領域の解析により、トマトにおいても *SES* の遺伝子発現は *TAG1* および *TAGL1* の制御を受けている可能性は高いが、*TAG1*、*TAGL1* 以外の制御因子も存在する可能性がある。また、*ses* 変異体における *SES* の発現は WT に比べて大きく減少していた (図 2-25B)。動物や植物の生体内ではナンセンス変異により生じた異常な短い mRNA を分解する “ナンセンスコドン依存性 mRNA 分解 (NMD; nonsense-mediated mRNA decay)” と呼ばれる機構が存在する (Lejeune and Maquat, 2005)。トマトにおいてもこの機構によって mRNA の分解がなされたと示唆されている報告がある (Gorguet et al., 2009)。これらより、*ses* 変異体における *SES* の発現量低下は NMD による mRNA の分解が働いたからであると考えられる。

花粉形成において、野生株は葯形成初期の L2 層より胞原細胞 (Archeporial cell) を形

成し、そこから花粉母細胞 (PMC), タペート組織 (Tapetum), 中間層 (Middle layer), 内被 (Endothecium) を形成する (図 2-32). 花粉母細胞が減数分裂を行った後, 花粉は形成される. しかし, *ses* 変異体では葯の発達において, 維管束と外皮しか形成されなかった (図 2-6A). 縦径 1 mm のつぼみにおける遺伝子発現解析の結果, *MS10³⁵* の遺伝子発現が劇的に減少していた (図 2-26A). *MS10³⁵* はシロイヌナズナの *DYT1* のオーソログ遺伝子であり, トマトおよびシロイヌナズナにおいて減数分裂とタペート組織の形成に重要であることが知られている (Zhang et al., 2006; Jeong et al., 2014). それらの機能欠損体 *ms10³⁵* 変異体と *dyl1* 変異体は花粉母細胞の形成は正常に行われるが, タペート組織の形成に異常が現れ, 花粉を正しく形成することができない (Zhang et al., 2006; Jeong et al., 2014). また, シロイヌナズナにおいて *DYT1* は *SPL/NZZ* の下流で働くことから (Zhang et al., 2006), トマトにおいても *MS10³⁵* は *SES* の下流で働いていると示唆される (図 2-32). 次に, シロイヌナズナ *EMS1/EXS* のホモログ遺伝子の発現を調査したところ, *EMS1/EXS-like^a* (*Solyc09g098420*) の発現は劇的に減少したが, *EMS1/EXS-like^b* (*Solyc03g026040*) の発現はわずかに減少しただけであった (図 2-26DE). シロイヌナズナにおいて *EMS1/EXS* は *TAPETAL DETERMINANT1 (TPD1)* というリガンドを持ち, 胞原細胞の数を決定する役割を持つ. その機能欠損株の *ems1/exs* 変異体および *tpd1* 変異体は野生株より多くの減数母細胞を形成し, タペート組織と中間層の欠損した雄性不稔の表現型を示すと報告されている (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002; Yang et al., 2003). シロイヌナズナにおいて *EMS1/EXS* は *SPL/NZZ* の下流および *DYT1* の上流で働くことが分かっている (Alvarez-Buylla et al., 2010; Plackett et al., 2011). これらより, トマトにおいても遺伝子発現の減少した *EMS1/EXS-like^a* (*Solyc09g098420*) はシロイヌナズナのホモログ遺伝子と同様の機能を持ち, さらに *SES* の下流で働くと示唆される (図 2-32). また, *BAM1/2* はシロイヌナズナにおいて *CLV1* 様のロイシンリッチ受容体キナーゼをコードしており, その二重変異体 *bam1 bam2* 変異体は葯形成において内被, 中間層, タペート組織の形成に異常がみられ, 雄性不稔を示すと報告されている (Hord et al., 2006). さらに, *BAM1/2* は *SPL/NZZ* により正に制御され, 反対に *SPL/NZZ* を負に制御すると示唆されているが (Hord et al., 2006), トマトを用いた本研究では, その様な関係性を見つけることはできなかった.

一方, 胚珠形成においても *SPL/NZZ* は重要な遺伝子であり, シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体は胚珠の発達において, 珠心の形成に異常がみられ, 稔性のない胚珠を形成する

(Schiefthaler et al., 1999). シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体では珠皮 (内珠皮, 外珠皮) の形成は野生株同様に行われたが (Sieber et al., 2004a; Bencivenga et al., 2011), トマト *ses* 変異体ではつぼみ縦径 2-3 mm のステージで珠皮および珠心の発達が見られず, 胚珠の発達が停止していた (図 2-6BC). また, シロイヌナズナにおいて *INO* は外珠皮の発達に重要な遺伝子であることが報告されている (Baker et al., 1997; Villanueva et al., 1999). そして, *spl/nzz* 変異体では *INO* の発現は野生株に比べて若干早まったものの, 発現部位と強度に大きな違いはみられていない (Balasubramanian and Schneitz, 2002). その反面, トマト *ses* 変異体では雌蕊において, *INO* の遺伝子発現が野生株に比べて劇的に減少していた (図 2-27B). 従って, トマトとシロイヌナズナでは珠皮の発達メカニズムが異なると示唆され, トマトの胚珠において *SES* が *INO* の発現を制御していると考えられる (図 2-32). さらに, トマトにおいて *INO* の遺伝子発現低下によって, トマトの一枚の珠皮 (Skinner et al., 2016) の発達が停止したことから, トマトの珠皮はシロイヌナズナにおける外珠皮と近い性質をしている可能性が高い.

シロイヌナズナにおいて, *WUS* の遺伝子発現が珠心で正確に発現することが胚珠の発達に重要である (Groß-Hardt et al., 2002). 本研究で *WUS* の遺伝子発現は, 調査したつぼみおよび雌蕊すべてのステージで有意に減少していた (図 2-27A). シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体においても, トマト *ses* 変異体同様に *WUS* の遺伝子発現が低下していたことから (Sieber et al., 2004a), *SES* および *SPL/NZZ* の発現は *WUS* の発現を誘導している と示唆される (図 2-32). また, *ANT-like* と *BEL1-like* の遺伝子発現は 4.5 mm のつぼみの雌蕊で, WT に比べて有意に減少した (図 2-27CG). シロイヌナズナにおいて *ANT* と *BEL1* は胚珠の珠皮の発達に重要な遺伝子であることが報告されている (Robinson-Beers et al., 1992; Elliott et al., 1996; Schneitz et al., 1997). そして, WT では *ANT* は珠皮と珠柄 (funiculus) で発現し, *BEL1* は珠皮で強く発現するが, シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体ではそれらの発現部位が異所的になることが分かっている (Balasubramanian and Schneitz, 2000). しかし, 本研究でトマト *ses* 変異体は *ANT* と *BEL1* の主な発現箇所である珠皮が形成されていなかった (図 2-6). つまり, トマト *ses* 変異体において *ANT-like* と *BEL1-like* の発現部位がなくなったことが, この発現量の減少をもたらしたと考えられる. また, シロイヌナズナにおいて, オーキシンの極性輸送に参与している遺伝子 *PINI* は正常な胚珠形成に必要であることが知られており, さらにその遺伝子発現は *SPL/NZZ* により誘導されることが報告されている (Bencivenga et al.,

2012; Ceccato et al., 2013). しかし、トマト *PINI* の遺伝子発現は *ses* 変異体において、4.5 mm のつぼみでわずかに減少したが、他のステージでは減少していなかった (図 2-27H). トマトにおいて *PIN* family 遺伝子は 10 個単離されており、いくつかの報告もあるが、いずれも胚珠の形態異常はみられていない (Mounet et al., 2012; Pattison and Catalá, 2012). 従って、トマトにおいて、*PINI* は *SES* の制御下ではなく、他の *PIN* 遺伝子が *SES* の制御を受け、胚珠形成に関与している可能性がある。もしくは、トマト *PIN* family は胚珠形成に関与していない可能性もある。さらに、シロイヌナズナにおいて Class III homeodomain leucine zipper (HD-ZIP III) 遺伝子である *CNA*, *PHB*, *PHV*, *REV* は胚珠の合点 (Chalaza) で発現し、*WUS* や *INO* の発現をそれぞれ珠心と胚珠原基の内側に制限する働きを持つことが分かっている (Kelley and Gasser, 2009; Kelly et al., 2009; Yamada et al., 2016). シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体では胚珠形成時の *PHB* の発現部位が合点から珠心へ移動しており、珠心における *WUS* の発現が低下していた (Sieber et al., 2004a). 本研究において、それら遺伝子のオーソログである *CNA-like*, *PHB/PHV-like*, *REV* の遺伝子発現が減少する傾向がみられた (図 2-17D-F). シロイヌナズナ *spl/nzz* 変異体で *PHB* が異所的な発現を示したことを考慮すると、トマトにおいても *CNA-like*, *PHB/PHV-like*, *REV* が異所的な発現を示した可能性があり、その結果発現量に差が生じたと考えられる。また、トマト *ses* 変異体の 1 mm のつぼみと 4.5 mm のつぼみの雌蕊で *GOB* の発現量の低下がみられた (図 2-27I). シロイヌナズナにおいて *GOB* のオーソログは心皮の縁の分裂組織 (Carpel margin meristems; CMMs) の安定を保つために重要な遺伝子である *CUC1*, *CUC2* であり、この遺伝子の欠損株は CMMs の形成が不安定になり、胚珠の形成にも異常がみられる (Kamiuchi et al., 2014). トマト *GOB* は複葉や鋸歯の形成に関与する遺伝子として知られており、心皮形成にも異常がみられることが報告されている (Berger et al., 2009). トマトにおいて CMMs の形成に関する知見は得られていないが、心皮の形成枚数が減少している *ses* 変異体で発現量が減少したことより、*GOB* も *CUC1* および *CUC2* と類似した機能を持つと考えられる。

ses 変異体は胚珠形成に異常がみられると同時に、子房が小さくなり、心皮の形成枚数が減少するという特徴を持つ。第 1 章でも述べたように心皮の数は花芽分裂組織の大きさと正の相関があり、その大きさは主に *WUS* と *CLV* (*CLV1*, *CLV2*, *CLV3*) によって制御されている (Durbak and Tax, 2011; Landau et al., 2015). その *CLV* 遺伝子とトマトにおいて心皮形成に関与している遺伝子 (*FAS*, *CLV1/FAB*, *CLV2*, *CLE3*, *FIN/HPAT3*; Xu et al.,

2015) の発現は, *ses* 変異体において減少傾向にあった (図 2-28C-G). *CLE3* を除いて心皮数が減少する表現型とは逆の発現パターンを示したため, *ses* 変異体の心皮数の減少はこれらの遺伝子とは独立して起きていると考えられる.

また, *ses* 変異体の果実肥大性に関連する 2 つの遺伝子発現を調査したところ, *FW2.2* は開花期の雌蕊で増加し, *FW3.2* は 1 mm のつぼみで減少していた (図 2-28HI). *FW2.2* は細胞分裂を負に制御している遺伝子であり (Frary et al., 2000), WT では受粉をシグナルとして細胞分裂が盛んになるため, *FW2.2* の発現が低下すると推測されるが, *ses* 変異体は受粉ができず, 細胞分裂も起きないため, このような結果になったと推測される. 一方, *FW3.2* は細胞分裂を正に制御している遺伝子であり (Chakrabarti et al., 2013), 1 mm のつぼみでの発現が減少したことは, 胚珠や花粉の形成に必要な細胞分裂が行われなくなったことに起因していると考えられる.

最後に, SES と生体内で複合体を形成しているタンパクの探索を行ったが, 本研究で候補に挙げた FCC2/CRCa と TCP29 を用いた組換え体 (*SESpt-FCC2-EAR*, *SESpt-TCP29-EAR*) は, WT への表現型の回復はみられなかった (図 2-31). シロイヌナズナにおいては SPL/NZZ と YABBY および TCP 転写因子と複合体を形成することが示されているが (Sieber et al., 2004b; Wei et al., 2015), トマトにおいては複合体を形成しない可能性もある. また, 単一のタンパクとの複合体だけではなく, 複数のタンパクとそれぞれ複合体を形成することで, 配偶子形成が誘導される可能性がある.

表2-1 クローニングおよびシーケンシングに用いたプライマーリスト

プライマー名	目的	プライマー配列 (5'-3')
SES-OX-Fw	OXコンストラクト	ATGGCTACTTCTCTTCAGTTTCTT
SES-OX-Rv	OXコンストラクト	CTAACAAGAAAGCTTCAGTGAAAGA
35S-Promoter-Fw	OXコンストラクト	CCCGGCCTAGGTCTCAGA
SES-Seq-Fw	シーケンシング	AGCCTTTGCTTCACTCATACAGTT
SES-Seq-Rv1	シーケンシング	TATAATTTCCAGGATCAGCACTAGC
SES-Seq-Rv2	シーケンシング	GATCATGTCCTCCATATGAACGC
SES-RNAi-Fw	RNAiコンストラクト	AGAAAAGGAAGATTCTGGAACAAAG
SES-RNAi-Rv	RNAiコンストラクト	CAATGGAAGTGGTAGGTGAAGTAGT
SES-Promoter-Fw	In-Fusion	GATTACGCCAAGCTTCAATTAGCGATGGACGAAGTT
SES-Promoter-Rv	In-Fusion	GATCCATGTTCTAGATTTTGGTGCAGAGAAAAAAC
SES-Terminator-Rv	In-Fusion	CTAGGACGCGTCGACCTCACTTCTAGACTGCCATAAAGC
SES-Check-Fw	コロニーPCR	AGGACGTAGAAGGTTCGAGTAAAAAT
SES-Check-Rv	コロニーPCR	TATAATTTCCAGGATCAGCACTAGC
pIG121hm-Rv4	シーケンシング	GCAATGGAATCCGAGGAG
SES-Check-Fw2	コロニーPCR	TCACTTTCCTGGTCAGATT
SES-Check-Rv2	コロニーPCR	TTTTTGGTGCAGAGAAAAAAC
SES-terminator-Fw	In-Fusion	CGGGAATTGCTACCGAGCTCTTTTTTTTTTCTACAGAATCATTT
SES-terminator-Rv2	In-Fusion	GATCGGGGAAATTCGAGCTCCTCACTTCTAGACTGCCAT
SESall-EAR motif-Fw	Inverted PCR	CCTACCAGTTCCATTGATCTTTC
SESall-Promoter-Rv	Inverted PCR	TTTCAATGGAACAGTAGTTGAAATT
FCC2-EAR motif-Fw	In-Fusion	ACTGTTCCATTGAAAATGTCTTCCTCATCTCCTAA
FCC2-EAR motif-Rv	In-Fusion	AATGGAAGTGGTAGGCTTCTCAGCCAAGGTCCC
TCP29-EAR motif-Fw	In-Fusion	ACTGTTCCATTGAAAATGAGTAACAAGGAGGATGA
TCP29-EAR motif-Rv	In-Fusion	AATGGAAGTGGTAGGCTTCTTTTCTTTTCCTTTCTG
FCC2-CDS-Fw	コロニーPCR	GCGTATTAAAGCAGCACATCCAC
TCP29-CDS-Fw	コロニーPCR	TTGCCTCGTTATCAGAGGTACG
SES-Seq-Fw	シーケンシング	TCTCTGCACCAAAAACACCT
SES-Terminator-Rv2	フラグメント増幅	CTCACTTCTAGACTGCCATAAAGC
SES-Seq-Fw2	シーケンシング	GTAGAAGGTTCGAGTAAAAATGGACA
SES-Seq-Fw3	シーケンシング	ACTCATGTTTCTCCGATCGC
SES-Seq-Fw4	シーケンシング	AGCCTTTGCTTCACTCATACAGTT

表2-2. A コロニーPCRの反応液の調製

Go-taq (Promega)	5.0 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
DDW	4.0 μ l
Total	10.0 μ l

表2-2. B PCR条件

95°C	2 min	} $\times 35$ cycles
95°C	30 sec	
55°C	30 sec	
72°C	1 min 30 sec	
72°C	5 min	
4°C	∞	

表2-3 プラスミドベクターの制限酵素処理

10 \times Buffer 3 (BioLabs)	2.0 μ l
<i>Hin</i> d III	0.3 μ l
<i>Sal</i> I	0.3 μ l
Plasmid	18.0 μ l
Total	20.6 μ l

表2-4. A Inverted PCR反応液の調製

10×PCR Buffer	2.0 µl
dNTP Mixture (2 mM)	2.0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.2 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl
DDW	12.9 µl
KOD-Plus-Neo (TOYOBO)	0.4 µl
Plasmid Vector	0.5 µl
Total	20.0 µl

表2-4. B PCR条件

94°C	2 min	} ×20 cycles
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	
68°C	17 min	
68°C	5 min	
4°C	∞	

表2-5 プラスミドベクターの制限酵素処理

PCR product	90.0 µl
<i>Dpn</i> I (10 units/µl)	3.6 µl

表2-6 DNAマーカーリスト

プライマー配列 (5'-3')				
マーカー名	マーカーの種類	Forward	Reverse	制限酵素
SES-Marker	-	ACACCATAGCTAGCCAGACCATGT	ACAATGAGCCACCAGTTGAAGCTC	<i>Bsl</i> I
SES2-Marker	dCAPs	CGGCGGTGGTAGTGCTAGTG	AAGTTGCAAATCCGTAGAGATTCATCTGAGATC	<i>Taq</i> α I

表2-7. A マーカー選抜 PCR反応液の調整

10×PCR Buffer	2.0 µl
dNTP Mixture (2 mM)	2.0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	1.2 µl
Forward Primer (10 µM)	0.6 µl
Reverse Primer (10 µM)	0.6 µl
DDW	12.3 µl
KOD-Plus-Neo (TOYOBO)	0.4 µl
DMSO	0.4 µl
Genome DNA	0.5 µl
Total	20.0 µl

表2-7. B PCR条件

94°C	2 min	} ×35 cycles
98°C	10 sec	
60°C	30 sec	
68°C	1 min 30 sec	
68°C	5 min	
4°C	∞	

表2-7. C PCR産物の制限酵素処理

Cut Smart (BioLabs)	1.1 µl
<i>Bsl</i> I	0.1 µl
PCR products	10.0 µl

表2-8. A マーカー選抜 PCR反応液の調整

10 × Ex Taq Buffer	2.0 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	1.6 µl
Forward Primer (10 µM)	0.5 µl
Reverse Primer (10 µM)	1.0 µl
DDW	14.3 µl
Ex Taq HS (TaKaRa)	0.1 µl
Genome DNA	0.5 µl
Total	20.0 µl

表2-8. B PCR条件

98°C	10 sec	} ×40 cycles
98°C	10 sec	
65°C	30 sec	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
4°C	∞	

表2-8. C PCR産物の制限酵素処理

Cut Smart (BioLabs)	1.1 µl
<i>Taq</i> α I	0.1 µl
PCR products	10.0 µl

表2-9 qRT-PCRに用いたプライマーリスト

Target gene	Solyc ID	Primer Sequence (5'-3')	
		Forward	Reverse
<i>SES</i>	<i>Solyc07g063670</i>	AGCCTTTGCTTCACTCATACAGTT	ACTCATCATCGTTGCTTCATTCTC
<i>MS10</i> ³⁵	<i>Solyc02g079810</i>	AAATGACACCAGTGCCACTG	AGTAGATTCCGTGGATGATCTCC
<i>BAM1/2-like</i> ^a	<i>Solyc02g091840</i>	AATTCCCGGGGACACAAAAG	ATAAACCCCGAGCCTAGAAAG
<i>BAM1/2-Like</i> ^b	<i>Solyc01g103530</i>	GTGCCTCAAGATGAAGCAATGC	CGAAGGTCGATGATATTCTGGTG
<i>EMS1/EXS-like</i> ^a	<i>Solyc09g098420</i>	TTTCGCGAACTGTTCAAGCC	ATTGTTGCCGAGTGAGATCCC
<i>EMS1/EXS-Like</i> ^b	<i>Solyc03g026040</i>	TCGTGGTTTGCGTTTCTTC	TTGAAATCCGGTCTCTGTTGG
<i>WUS</i>	<i>Solyc02g083950</i>	AAGAAGAGGGCTATTGCTGCTG	ACCCCATGTGAAGATGGTGATG
<i>INO</i>	<i>Solyc05g005240</i>	TACCCCAACATGACTCACAAGC	TTGCTATCTCTTGGGACCATGG
<i>ANT-like</i>	<i>Solyc04g077490</i>	CTGCTGCCTCATTAGTCTTTGC	AAAGACTGGTAGGTGAGCCATG
<i>REV</i>	<i>Solyc11g069470</i>	ACTCGACATGCTGGAGACAAC	AGATACCACCAGGCAAACACG
<i>CNA-like</i>	<i>Solyc03g120910</i>	GTCTAGTGCCGTTTCAGTTTG	ACCAGCTCTGTTACTCTGCTTC
<i>PHB/PHV-like</i>	<i>Solyc02g024070</i>	GCTCTCGTTCTCTTGGAGGAG	TCTCCTCTCTGTAAACACAAGGC
<i>BEL1-like</i>	<i>Solyc08g081400</i>	TGATGGAGACTCATCCTTGGAG	CCAGTTTGGCGAGCTAAAATG
<i>PIN1-like</i>	<i>Solyc03g118740</i>	CCCACAACCCCAATAAACCAAAAC	GCACAACAGCAGTCATAACATGG
<i>GOB</i>	<i>Solyc07g062840</i>	TGCATGAATATCGCCTTGATGG	AGTAGCGGCACCATTAGAACC
<i>TAG1</i>	<i>Solyc02g071730</i>	GCAGAAGAGGGAAGTTGATTTACAC	GTCTAGGGTAATGGTTGTTGGTTTG
<i>TAGL1</i>	<i>Solyc07g055920</i>	TGGAGGAACTGGTGGAGGA	CAGCATGGTGTTTCTTGTACCTATC
<i>FAS</i>	<i>Solyc11g071810</i>	AGCTCTACCCCTTCAAGATGTTT	CGTTGTCTTTTCTCTGGTGGA
<i>CLV1/FAB</i>	<i>Solyc04g081590</i>	CTCGCCAAATTCTTGCAGGATG	TTCACCTACTGGCTTGTGACC
<i>CLV2</i>	<i>Solyc04g056640</i>	GACACAGCTCAACTTGTCACAC	ATGCCTCGACAATCCTACTTGG
<i>CLV3</i>	<i>Solyc11g071380</i>	GCTCCTGTGAAACTCCTAAACAG	TGATGCAATGGATCAGGACCAG
<i>CLE3</i>	<i>Solyc02g067550</i>	GCAGCCAAAACAGTACTGGAAC	TCAAGCTCGGATGCGTGTATC
<i>CLE9</i>	<i>Solyc06g074060</i>	GCTGCGTGATCACTTCATTAC	TGATGATGCAAAGGGTCTGGAC
<i>FIN/HPAT3</i>	<i>Solyc11g064850</i>	CCTCTTCTGAAGGATTGGATCG	AGATCTCCACGAGCCAAGTTTG
<i>FW2.2</i>	<i>Solyc02g090730</i>	GAGCTTAAGAACCGTGGCTTTG	GCATACATTTACCTGGTCATGC
<i>FW3.2</i>	<i>Solyc03g114940</i>	GCTGGAATGCTGCAGATGAAG	CCAACTTCAGCGTCGATTTCAC
<i>SAND</i>	<i>Solyc03g115810</i>	TTGCTTGGAGGAACAGACG	GCAAACAGAACCCCTGAATC

表2-10 *ses* 変異体と *ses2* 変異体のアレリズムテスト

F ₁ の個体数		4	3	6	6
遺伝子型	<i>ses</i>	-	-	+	+
	<i>ses2</i>	-	+	-	+
表現型		<i>ses</i>	WT	WT	WT

遺伝子型の + は野生型, - は変異型を示す.

表現型の *ses* は *ses* 変異体の表現型を, WT は野生型の表現型を示す.

表2-11 各組換え体作出ステージにおける *SES*-OX組換え体の個体数

ステージ	個体数
感染させた子葉切片	224
カルス化した切片	16
側根を形成したシュート	15
二倍体 (系統数)	6 (3)
導入遺伝子を持つ個体	0

二倍体の個体数は全ての個体数と系統数を示す.

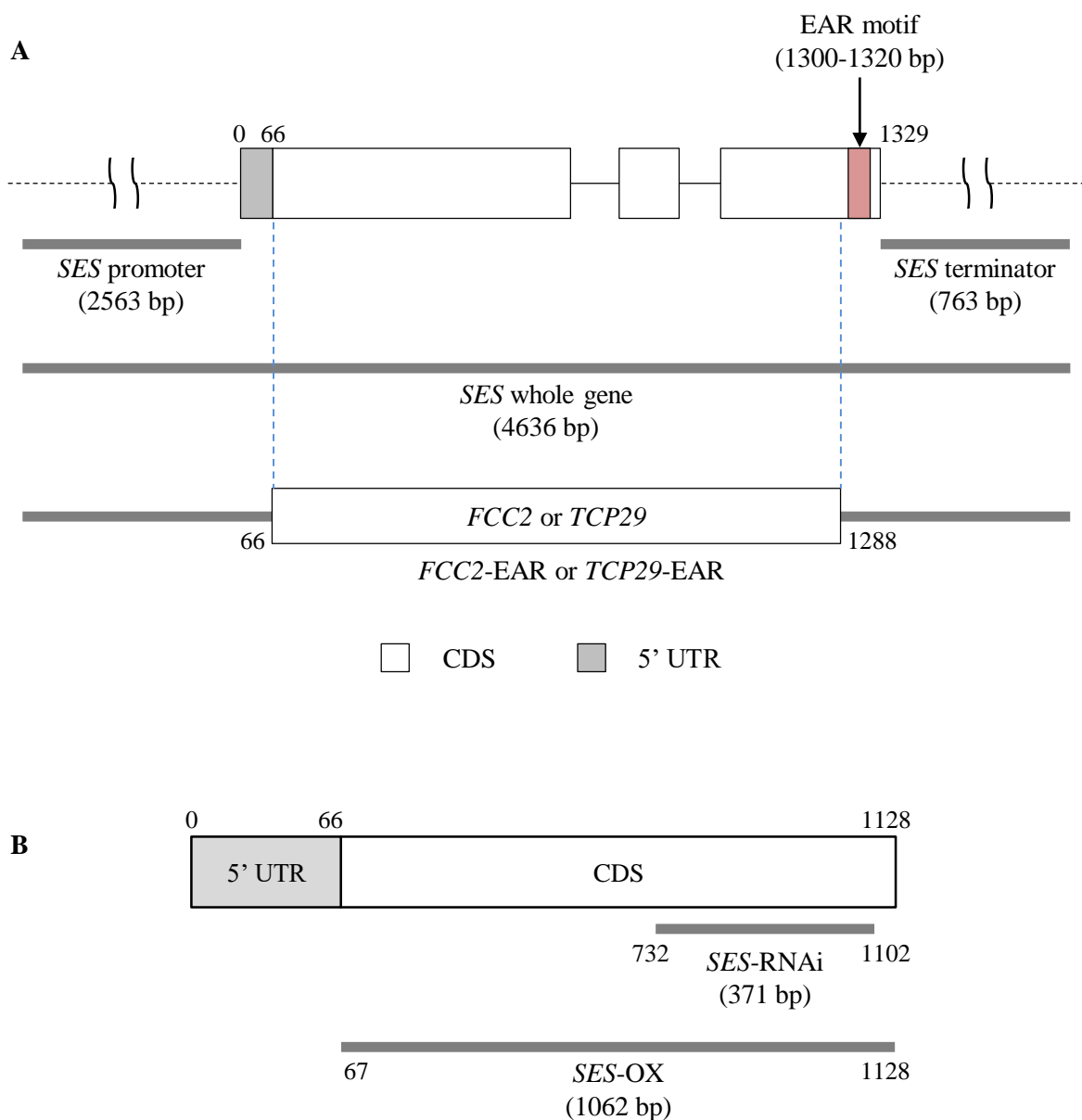


図2-1 形質転換体作製に用いたクローニングサイト

A, *SES*のゲノム構造とゲノムDNAからクローニングしたクローニングサイト。ボックス, エキソン; 実線, インترون; 破線, *SES*遺伝子の上流および下流の領域; 赤ボックス, EARモチーフ; 灰色バー, クローニング領域。

B, *SES*のmRNA構造と合成cDNAからクローニングしたクローニングサイト。灰色バー, クローニング領域。

bp, base pair; CDS, coding sequence 翻訳領域; UTR, untranslated region 非翻訳領域。

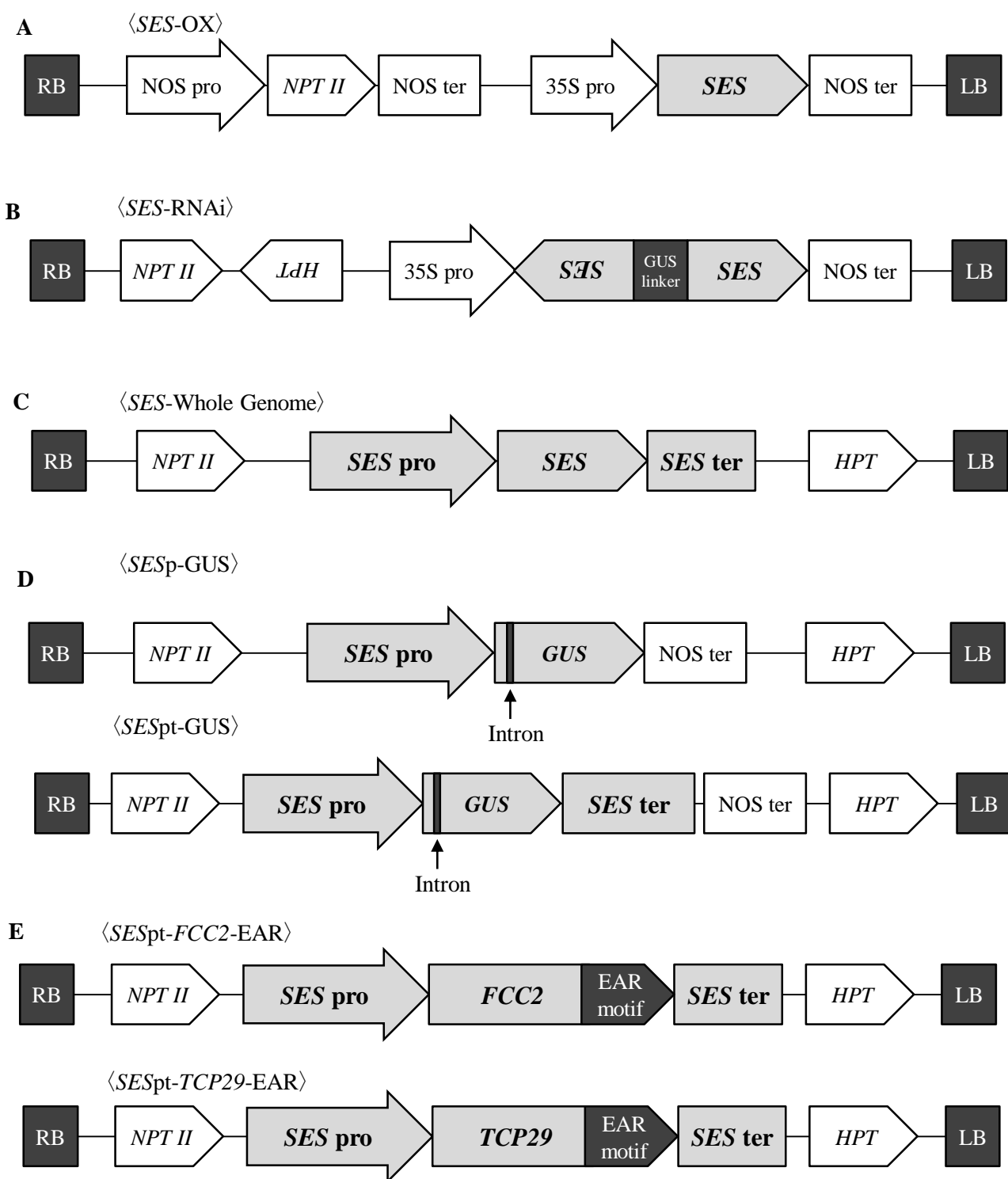



図2-2 構築したコンストラクト

A, *SES*過剰発現用コンストラクト. B, *SES*発現抑制用コンストラクト. C, *SES*全長導入用コンストラクト. D, *GUS*発現解析用コンストラクト. E, 作用機構解明用コンストラクト. RB, right border; LB, left border; *NPT II*, カナマイシン耐性遺伝子; *HPT*, ハイグロマイシン耐性遺伝子; 35S pro, CaMV35Sプロモーター; pro, プロモーター; ter, ターミネター.

A

SES  353 a.a.

 Plant transcription factor NOZZLE (29-215 a.a.)

 EAR motif (345-351 a.a.)

B

Tomato SES	1	MATSLQF-SLDHHP IQENHOTMNQ---TSTG-----GRRRSSK	35
Arabidopsis SPL/NZZ	1	MATSLFFMSTDDQNSVGNPNDLLRNTRLVNVSSGEIRTETLKSRRKPGSK	50
	36	NGQKKKKQPQ-RGMGVEQLERLRVQDQIKNST IHGVHHNHQYYSNNFNP	84
	51	TGQQKQKKPTLRGMVAKLERQRIEEKKQ-----	80
	85	LTPLSSFTGGGSASADPGNYSNLSLNSSPVLFQPKLCAVSPNDFFMQKQV	134
	81	---LAAATVGDTSV-----ASISNNATRLPVP---VDPG-----V	110
	135	VNTGFIGSSSTNQLMISSHDHHQ--FGSGMNL YGFATSKPSTEKSKELYP	182
	111	VLQGFPSLGSNRI YCGGVGSGQVMIDPVISPWGFVETSTTHELSSI-S	159
	183	MPNLF--SSNNSCFSDRCRSCNKKRMINGEE ISVHMEDMIREKEDSGTK	230
	160	NPQMFNASSNN-----RCDTCFKKKR-LDGDQ-----NNVVRNNGGFSK	198
	231	----PLLHSYS---LPS-HQKKGVEIVAIHRKGSSSALSSDEGAVMMEY	271
	199	YTMIPPPMNGYDQYLLQSDHHQRSQGFLYDHR IARAASVSA-----	239
	272	DFPEKISSKSTNTYKSCFENEATTMAYNSP--ESSFAAAAAATGNII	319
	240	-----SSTINPY---FNEATN---HTGPMEFGSY-----MEGNPR	270
	320	N-----GEASSVT--TISWAADTTTTTPTSSIDLSLKLS	352
	271	NGSGGVKEYEFPKGYGERVSVVAKTSSLVGDSPNT----IDLSLKL-	314
	353	C	353
	315	-	314

図2-3 SESタンパクの構造

A, SESタンパクのドメイン構造.

黄色ボックス, Plant transcription factor NOZZLE; 赤ボックス, EAR motif; a.a., amino acid.

B, SESタンパクとシロイヌナズナSPL/NZZとのアミノ酸配列の比較.

赤枠, EAR motif.

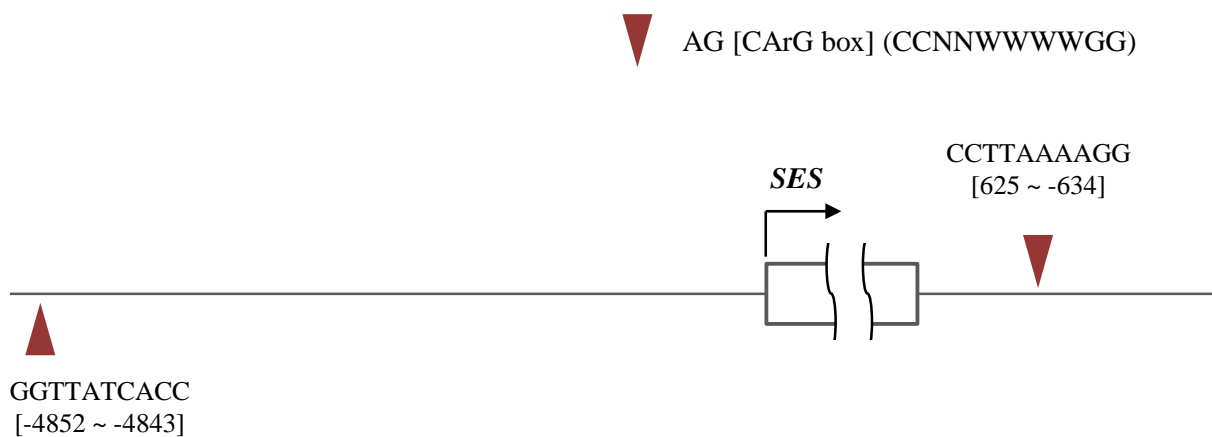


図2-4 *SES*のプロモーターとターミネーター領域における転写因子AGの結合配列の探索

見つかった配列とその場所 (転写領域からの距離) を示す.

ボックスは*SES*のmRNA; 実線は各遺伝子の上流および下流の配列; 赤三角はAGとの結合配列を示す. 下向きの三角 (バーの上) はセンス鎖に, 上向きの三角 (バーの下) はアンチセンス鎖に結合配列があることを示す.

N = A or T or G or C; W = A or T.

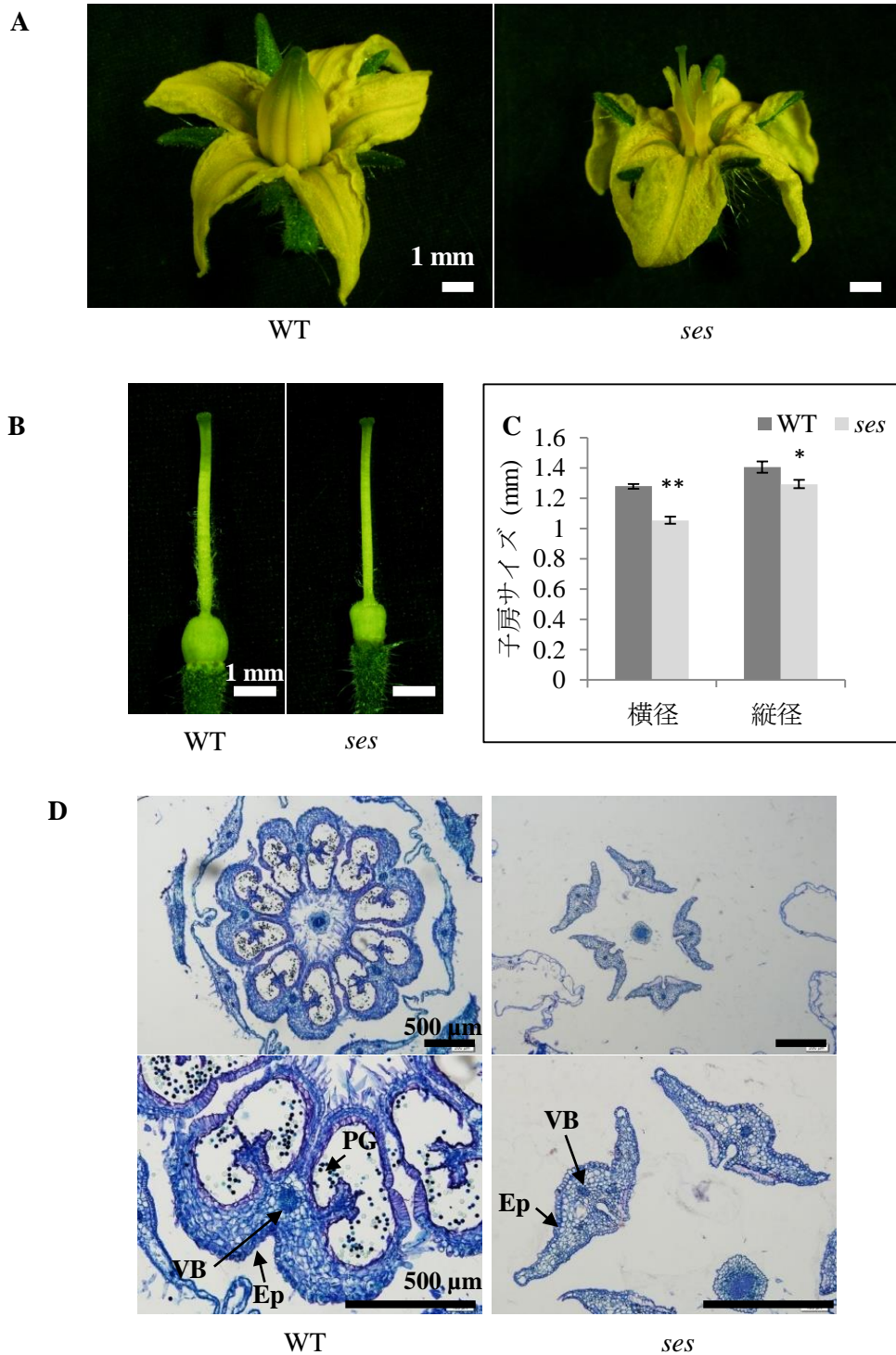


図2-5 *ses*変異体の開花期の花器形態の比較

A, 開花期花器の比較. 左, WT; 右, *ses*変異体. スケールバー = 1 mm.

B, 開花期雌蕊の比較. 左, WT; 右, *ses*変異体. スケールバー = 1 mm.

C, 開花期の子房の大きさ. エラーバー = 標準誤差 (SE). アスタリスクはStudent's t検定による有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

D, 開花期葯の横断切片の比較. 左, WT; 右, *ses*変異体. スケールバー = 500 μm .

Ep, epidermis 外皮; PG, pollen grain 花粉; VB, vascular bundle 維管束.

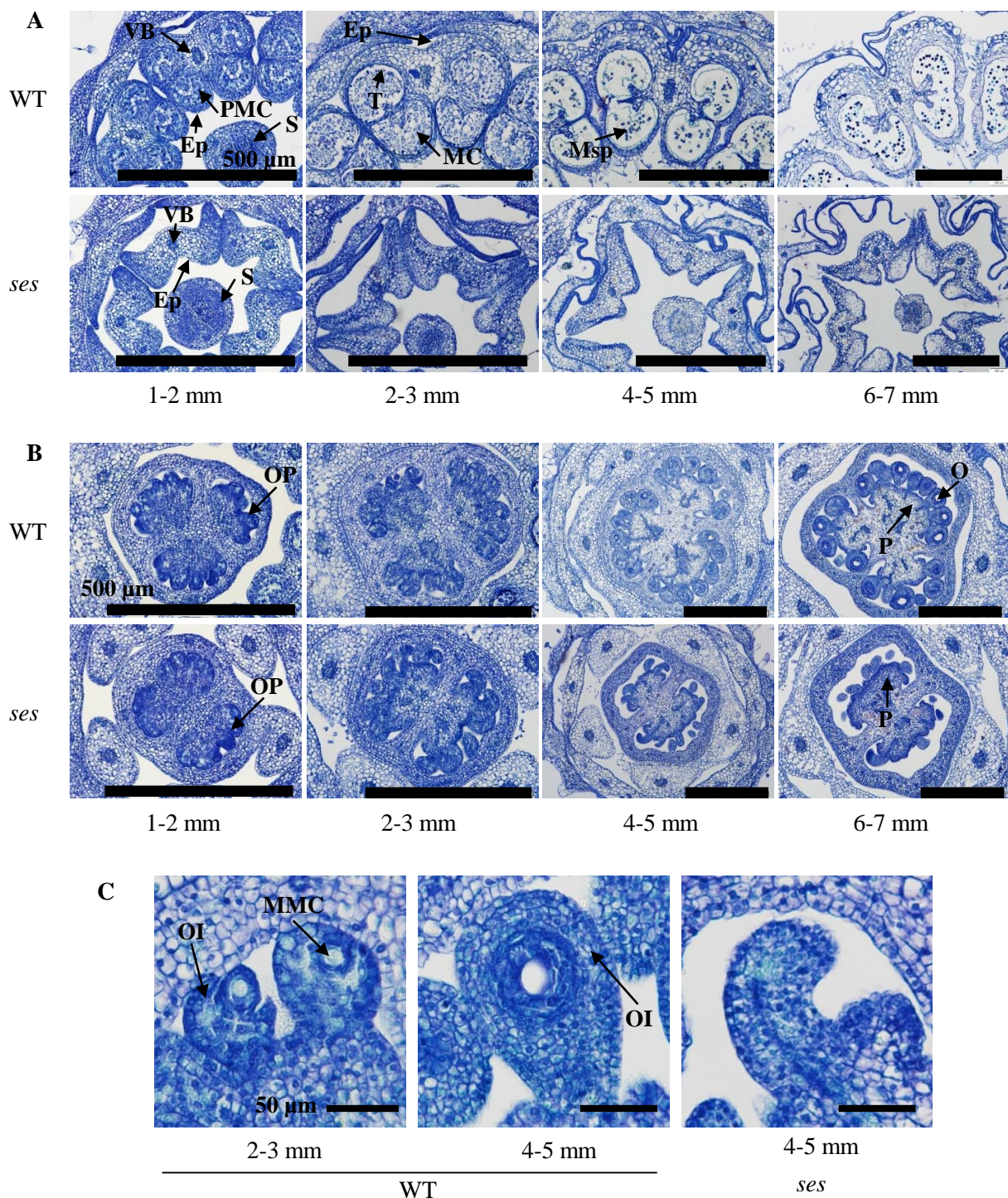


図2-6 *ses*変異体のつばみ発達段階別の葯および子房の形態比較

つばみの大きさを縦径でステージ分けして、切片を作製し観察した。

A, 発達段階別の葯の横断面。上段, WT; 下段, *ses*変異体。スケールバー = 500 μ m。

Ep, epidermis 外皮; MC, meiotic cell 減数分裂細胞; Msp, microspore 小孢子; PMC, pollen mother cell 花粉母細胞; S, style 花柱; T, tapetum タペト組織; VB, vascular bundle 維管束。

B, 発達段階別の子房の横断面。上段, WT; 下段, *ses*変異体。スケールバー = 500 μ m。

O, ovule 胚珠; OP, ovule primordia 胚珠原基; P, placenta 胎座。

C, 胚珠の発達の様子。左と中央, WT; 右, *ses*変異体。スケールバー = 50 μ m。

MMC, megaspore mother cell 大孢子母細胞; OI, ovule integument 珠皮。

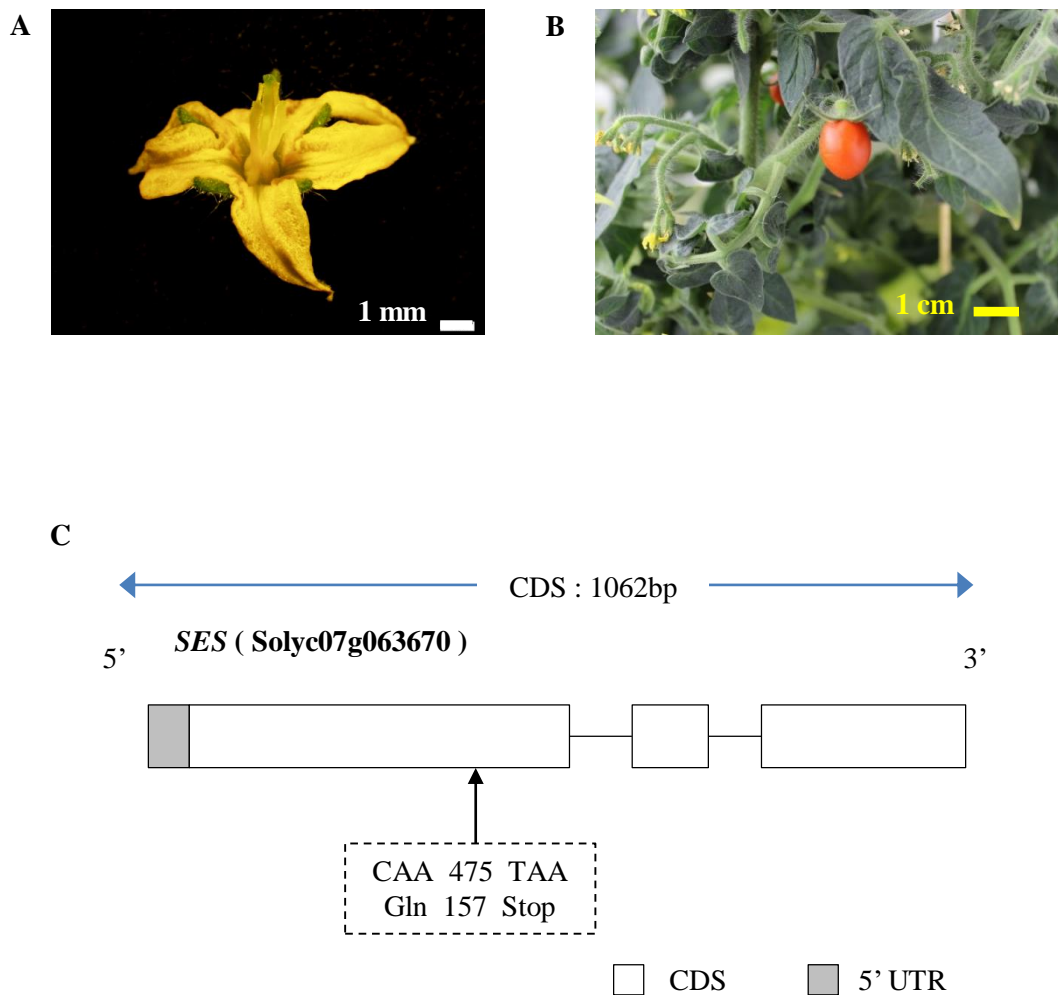


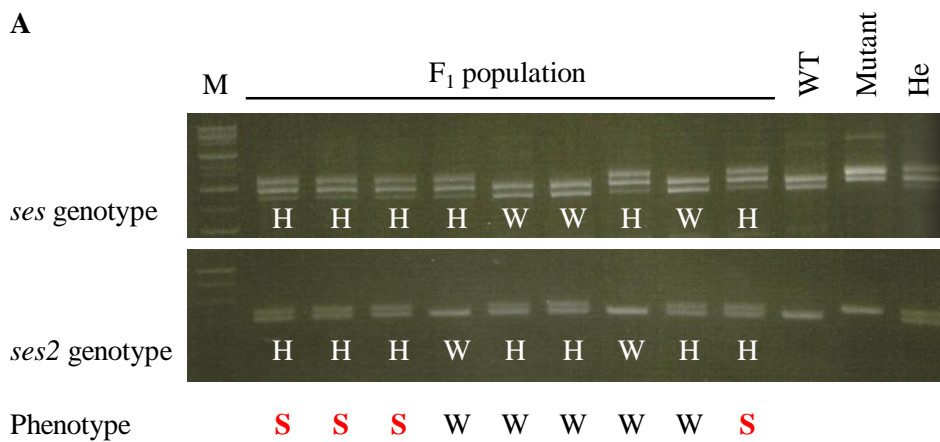
図2-7 *ses2*変異体の花器および単為結果果実形態と原因遺伝子

A, 開花期の花器. スケールバー = 1 mm.

B, 単為結果果実. スケールバー = 1 cm.

C, *ses2*変異体の持つ*SES*遺伝子内のSNP.

塩基置換およびアミノ酸置換の場所は翻訳開始点からの数字で示す.
ボックス, エキソン; 実線, インترون. Gln, グルタミン; Stop, ストップコドン.



B



WT/WT
or
ses/WT
or
ses2/WT



ses/*ses2*

図2-8 *ses*変異体と*ses2*変異体のアレリズムテスト

A, DNAマーカを用いた交配F₁集団の遺伝子型とその個体の表現型

*ses*マーカおよび*ses2*マーカを用いたときのバンドパターンとその遺伝子型とその個体の表現型を示す. He (H), ヘテロザイガス型; S, *ses*変異体型; W, 野生型.

B, 交配F₁集団の花器の表現型

左, *ses*および*ses2*の遺伝子型のどちらか一方がヘテロザイガス型を示した個体, もしくはどちらもWT型を示した個体; 右, *ses*および*ses2*の遺伝子型がどちらもヘテロザイガス型を示した個体.

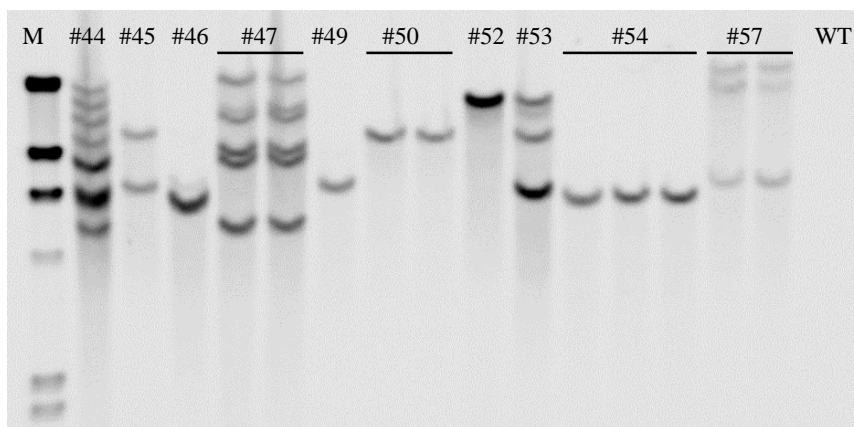
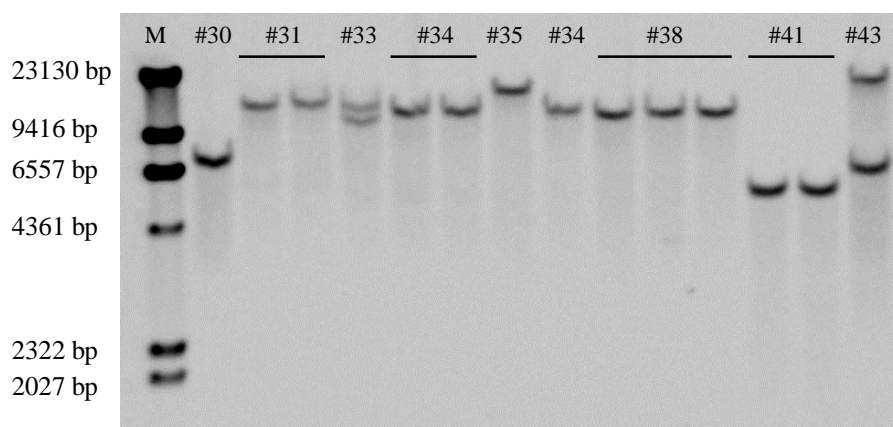
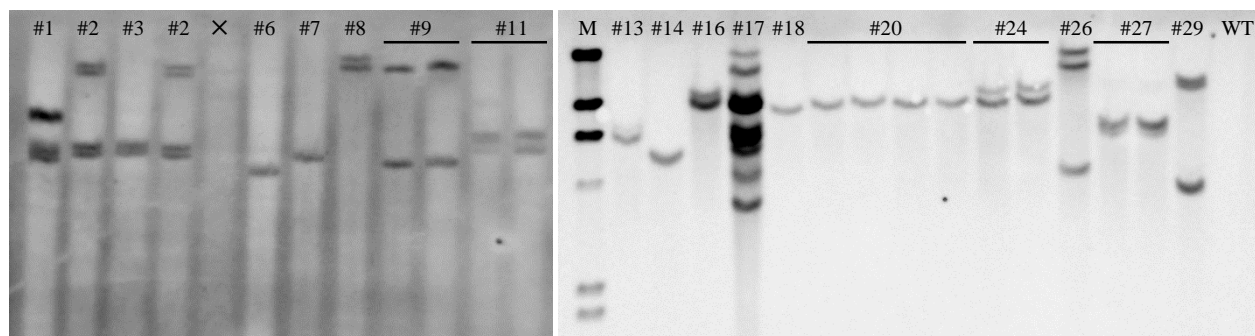


図2-9 *SES*-RNAi組換え個体のサザンブロット解析
組換えT0個体のゲノムDNAを使用. M, 分子量マーカー.

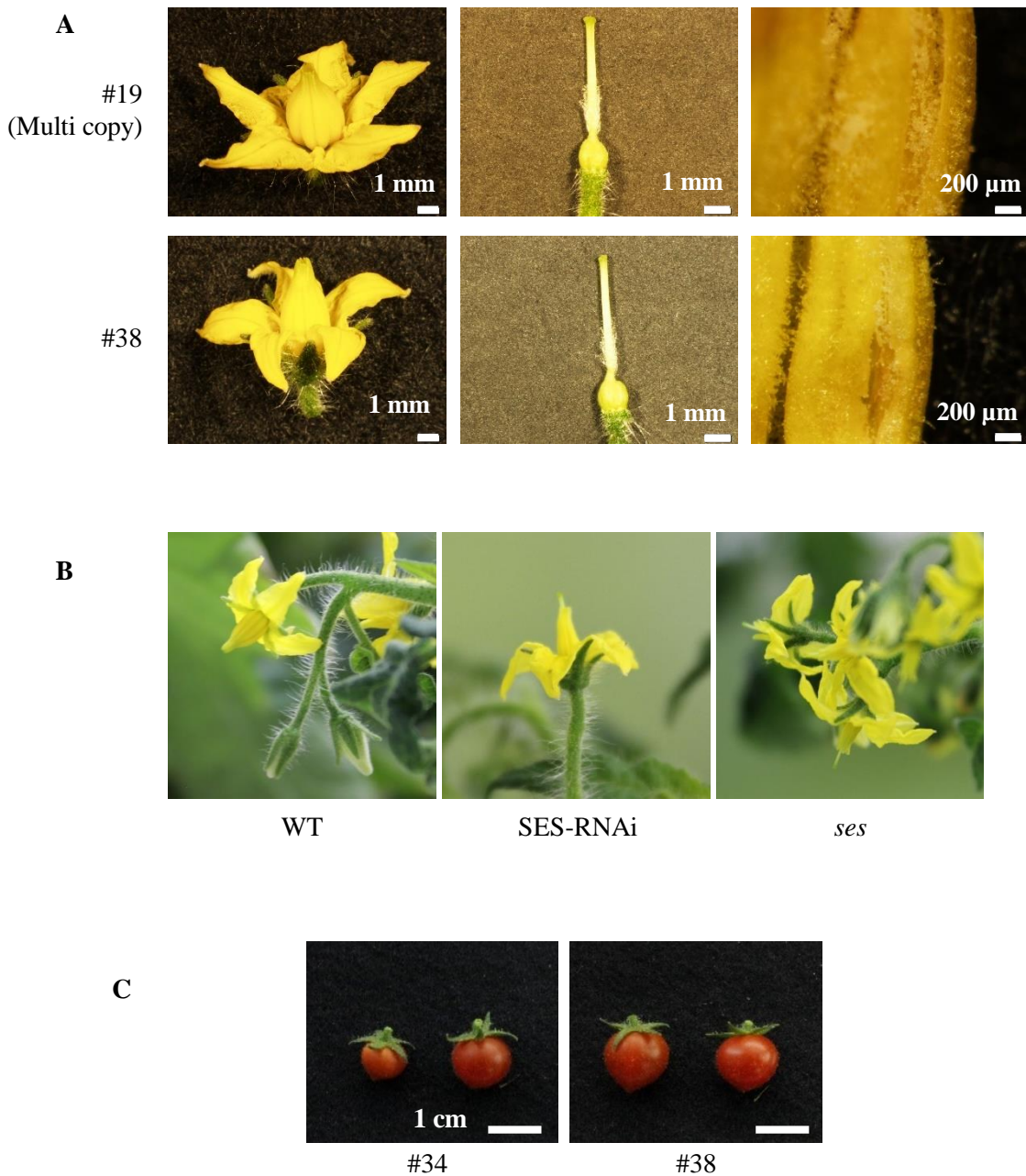


図2-10 *SES*-RNAi組換えT0個体の形態の比較

A, *SES*-RNAi組換え個体の開花期の花器の形態

上段, #19; 下段, #38; 左, 花器全体; 中央, 開花期雌蕊; 右, 開花期葯とその内部. スケールバー = 1 mm, 1 mm, 200 μ m (左から).

B, *SES*-RNAi組換えT0個体とWTおよび*ses*変異体の花柱の突出具合の比較

左, 野生株; 中央, *SES*-RNAi組換え個体; 右, *ses*変異体.

C, *SES*-RNAi組換え個体の赤熟果実の形態

左, #34; 右, #38.

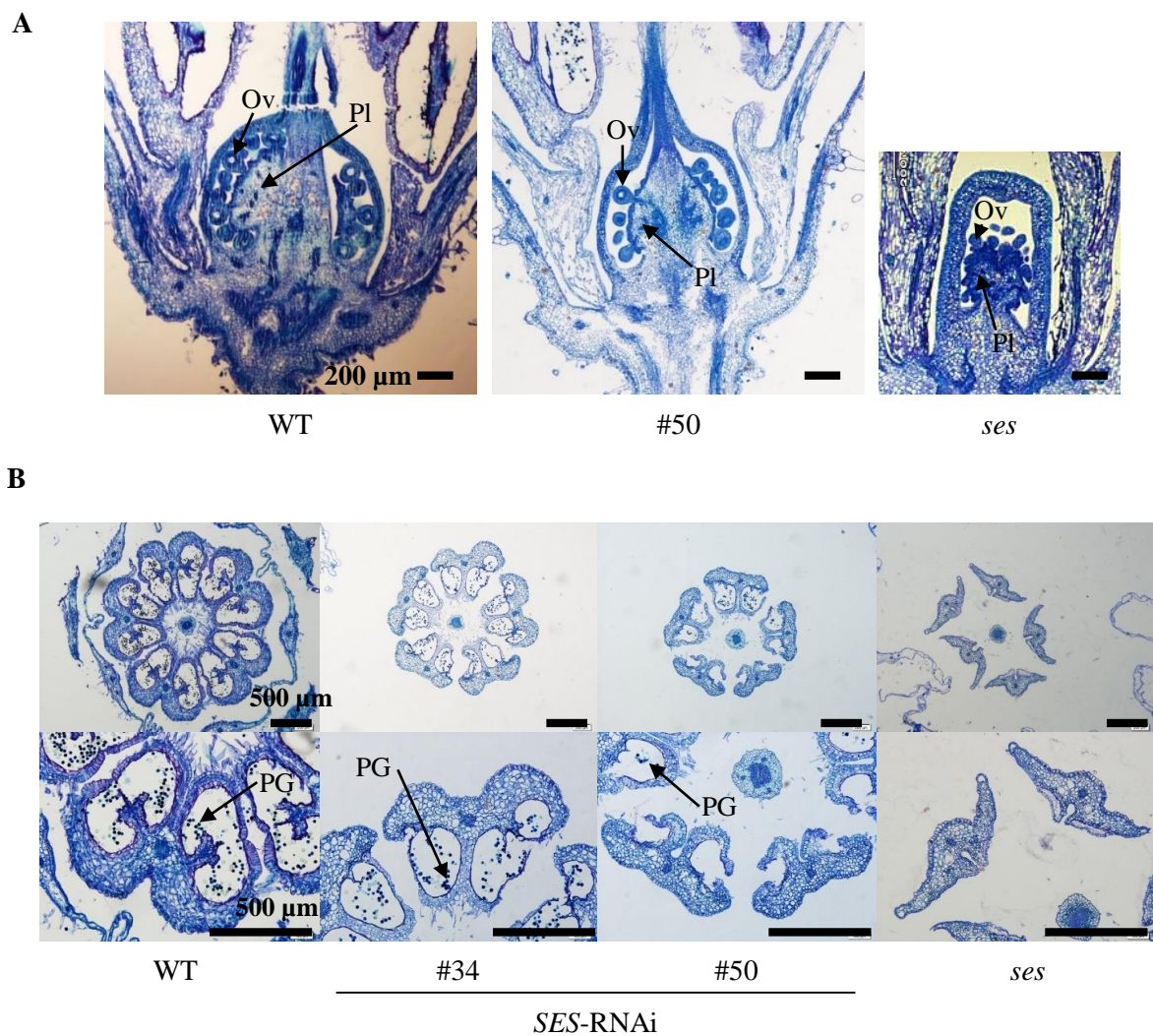


図2-11 *SES*-RNAi組換えT0個体の開花期花器の切片の比較

A, 開花期雌蕊の縦断切片

左, 野生株; 中央, *SES*-RNAi組換え個体#50; 右, *ses*変異体. スケールバー = 200 μ m.

B, 開花期葯の横断切片

上段, 横断面全体図; 下段, 葯の拡大図; 左から野生株, *SES*-RNAi組換え個体#34, #50, *ses*変異体. スケールバー = 500 μ m.

Ov, ovule 胚珠; Pl, placenta 胎座; PG, pollen grain 葯.

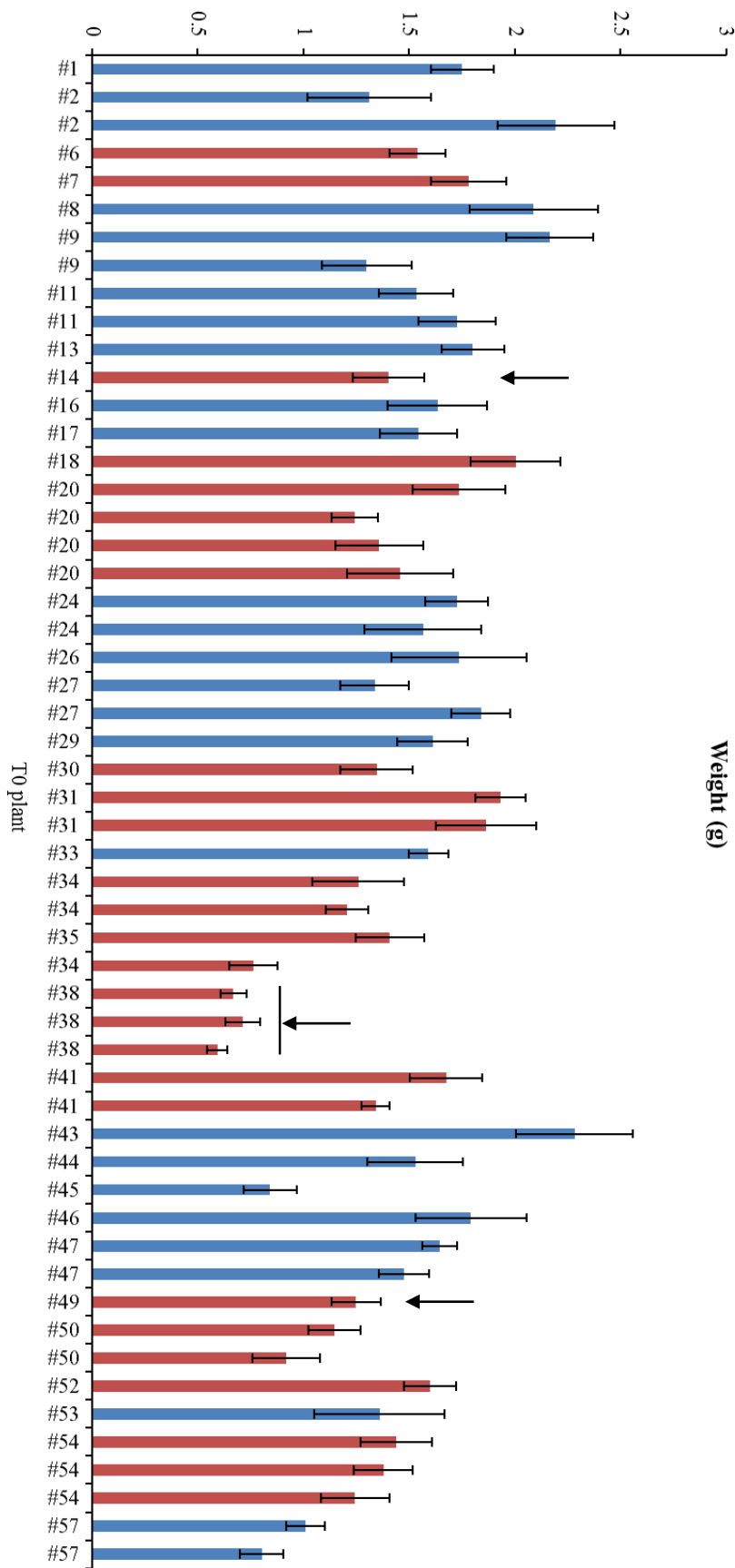


図2-12A *SES*-RNAi組換えT0個体の果実重の比較

Red bar, シングルコピーの組換え体; blue bar, マルチコピーの組換え体; エラーバー, 標準誤差 (SE). $N \geq 5$.

矢印は次世代 (T1) に進めた個体を示す.

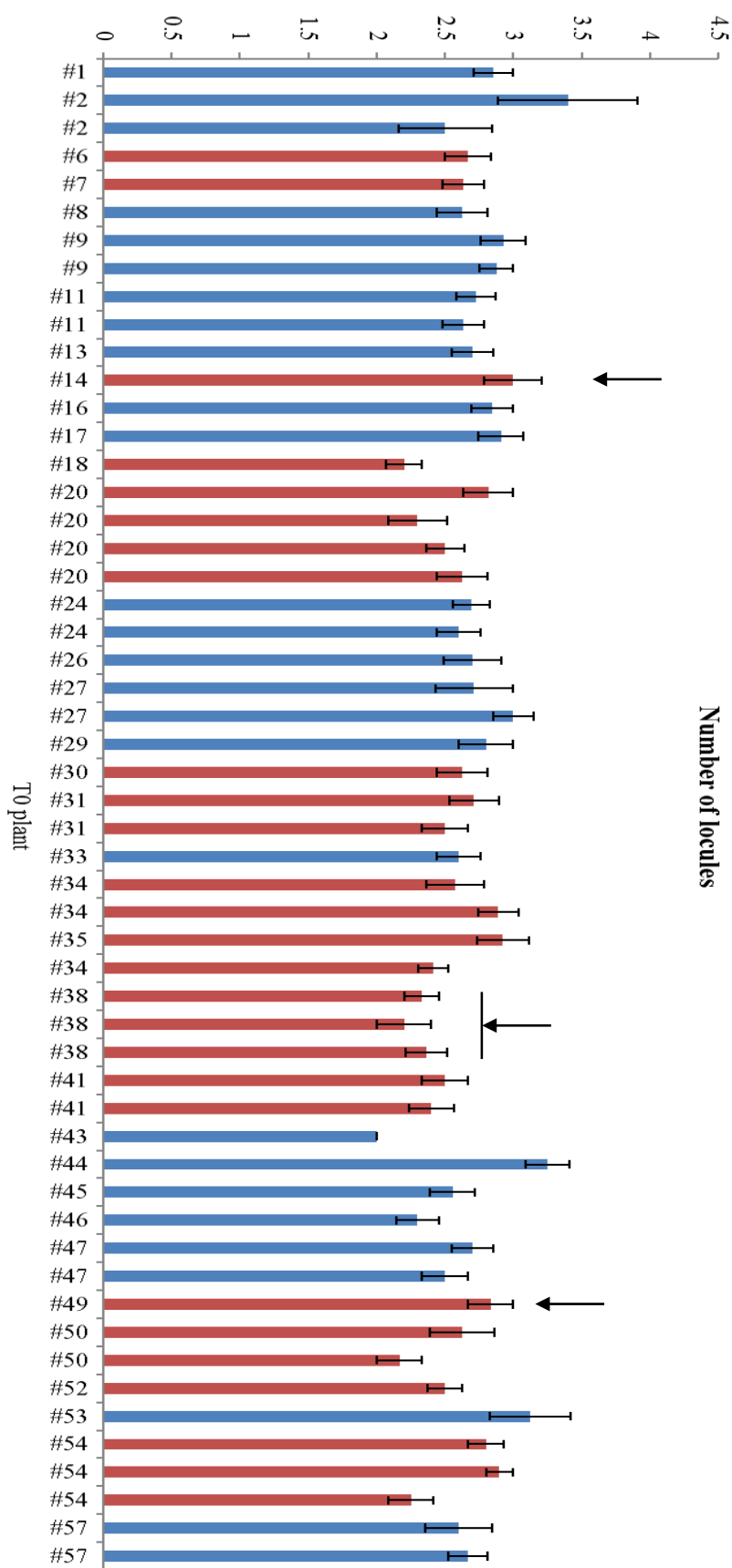


図2-12B *SES*-RNAi組換えT0個体の果実横断面にみられる子室の数の比較

Red bar, シングルコピーの組換え体; blue bar, マルチコピーの組換え体; エラーバー, 標準誤差 (SE). $N \geq 5$.

矢印は次世代 (T1) に進めた個体を示す.

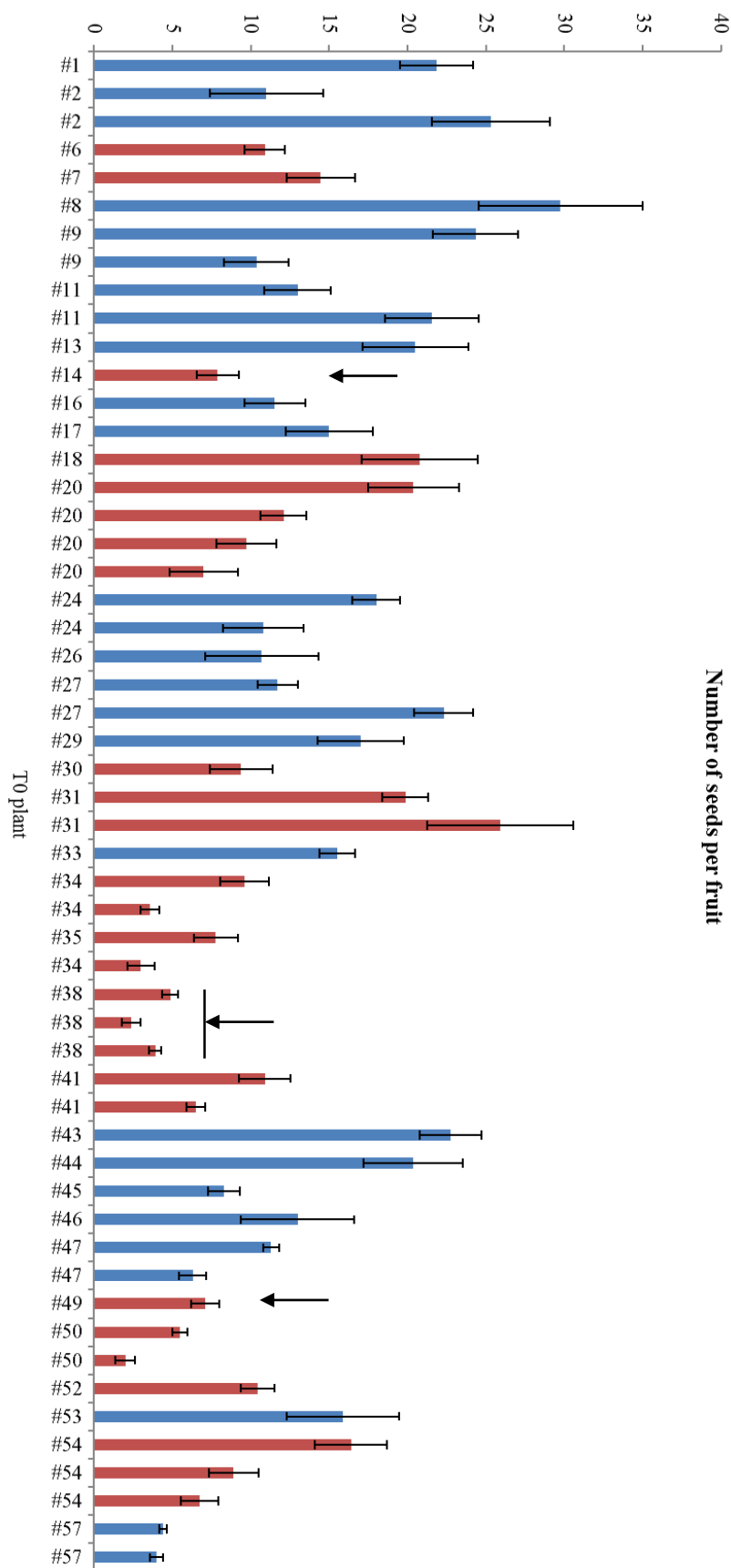


図2-12C *SES*-RNAi組換えT0個体1果実あたりの種子数の比較

Red bar, シングルコピーの組換え体; blue bar, マルチコピーの組換え体; エラーバー, 標準誤差 (SE). $N \geq 5$.

矢印は次世代 (T1) に進めた個体を示す.

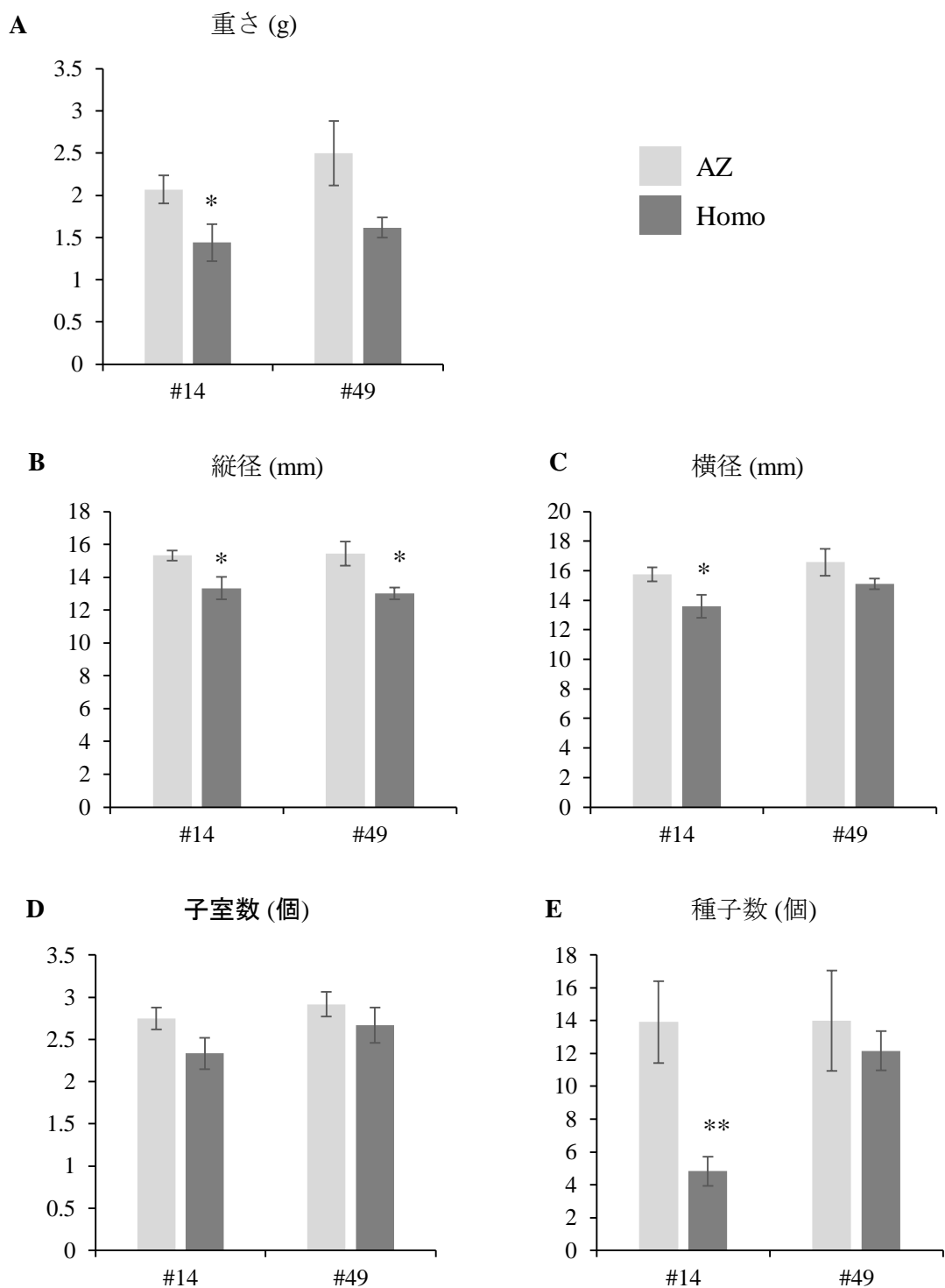


図2-13 SES-RNAi組換えT1個体の果実特性

A, 果実重; B, 果実縦径; C, 果実横径; D, 果実横断面にみられる子室数; E, 1果実あたりの種子数. $N \geq 6$. エラーバー = 標準誤差. アスタリスクはT検定による有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

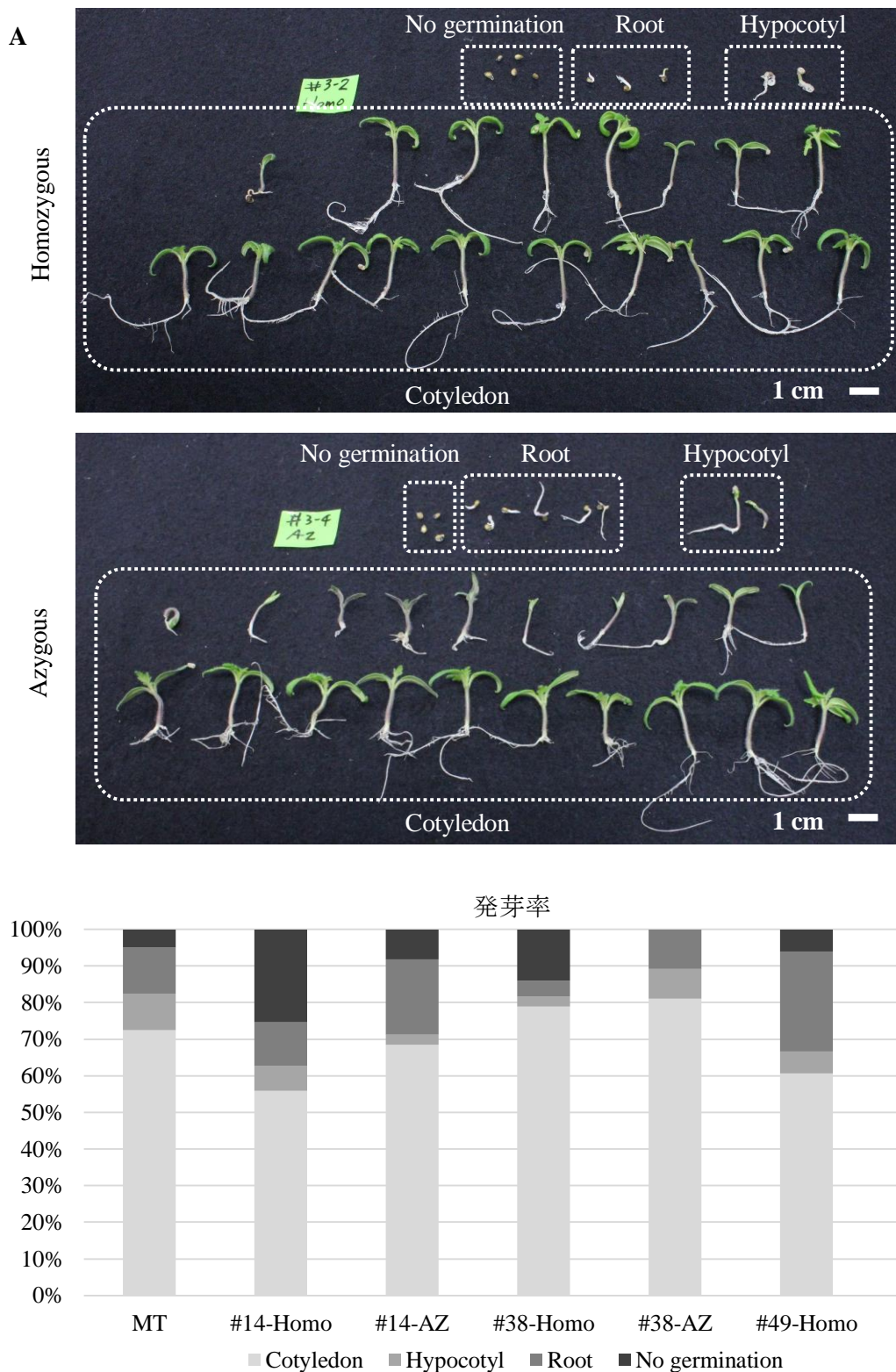


図2-14 *SES*-RNAi組換え個体の発芽率の比較

A, 播種後約1週間の幼苗の形態. 上, ホモザイガス; 下, アザイガス.

B, *SES*-RNAi組換え個体の幼苗の形態とその比率

MT, Micro-Tom (WT); Homo, ホモザイガス; AZ, アザイガス.

組換えT1世代より採種した種子を用いた. Cotyledon, 子葉まで正常に発芽した個体; hypocotyl, 胚軸まで形成された個体; root, 根まで形成された個体; No germination, 種子の状態から変化がみられなかった個体.

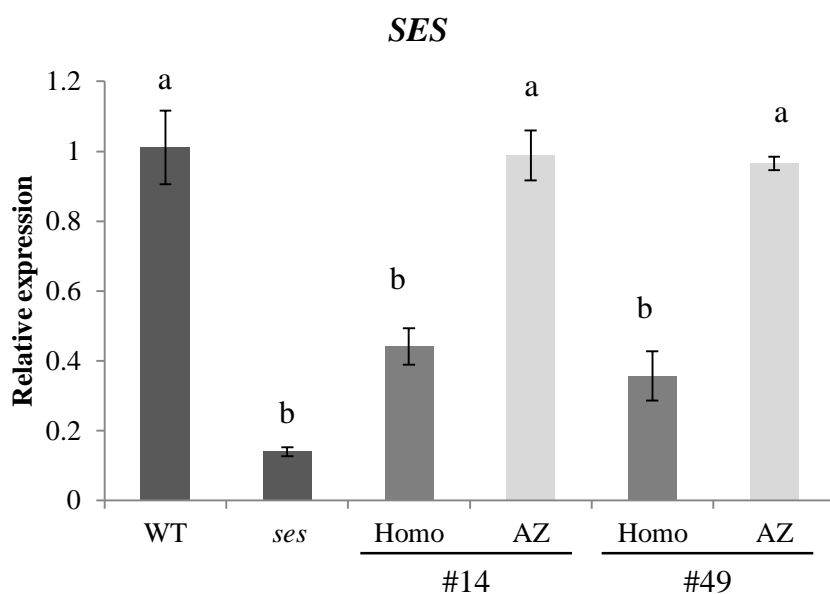


図2-15 *SES*-RNAi組換え個体の発現解析

T2世代の縦径1 mm以下のつばみ全体から合成したcDNAを用いて発現解析を行った. N = 3. エラーバー = 標準誤差 (SE). Homo, ホモザイガス; AZ, アザイガス. 異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer法; $P < 0.01$).

A

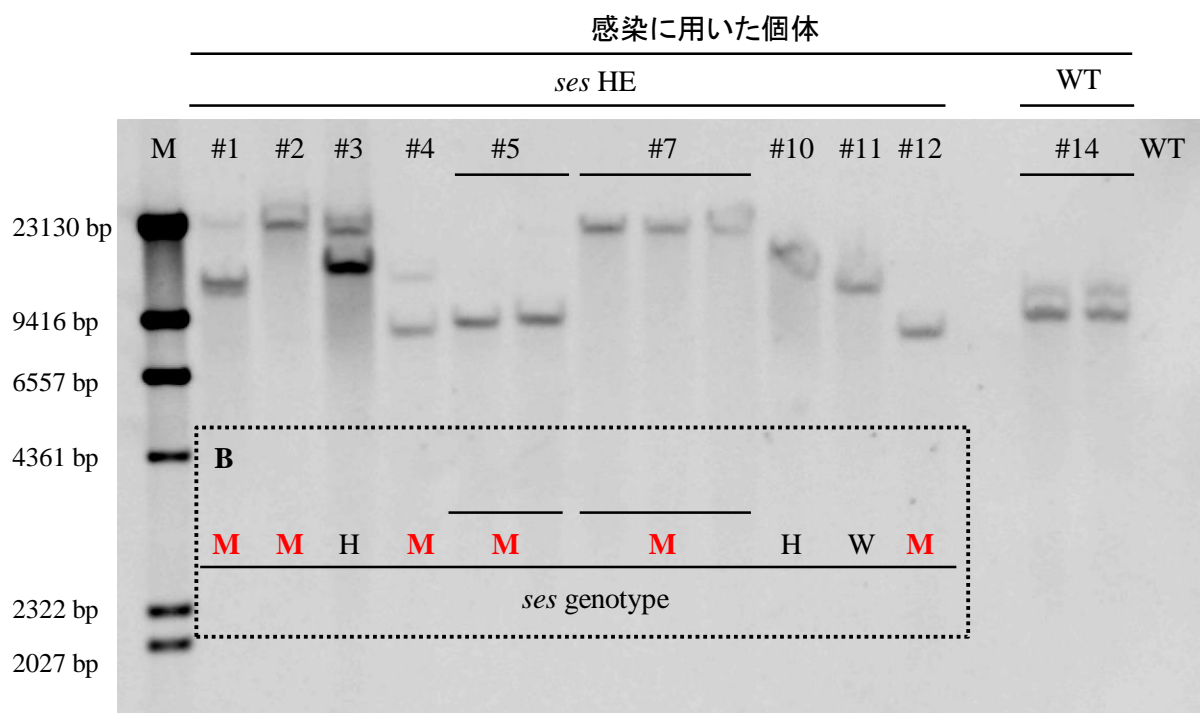


図2-16 *SES*-Whole組換えT0個体のサザンブロット解析とDNAマーカーによる*ses*の遺伝子型の確認

A, *SES*-Whole組換えT0個体のサザンブロット解析

*ses*変異体のHE個体および野生株から得られた種子を播種し, その子葉を感染に使用した. サザンブロット解析には組換えT0個体のゲノムDNAを使用した. M, 分子量マーカー. HE, ヘテロザイガス.

B, DNAマーカーによる*ses*の遺伝子型の確認

H, ヘテロザイガス型を示した個体; M, 変異型を示した個体; W, 野生型を示した個体.



図2-17 *SES-Whole*組換えT0個体の花器官と花粉の観察

上段, *SES-Whole*組換え個体#2; 下段, *SES-Whole*組換え個体#7; 左, 花器官全体; 右, 葯とその内部.

スケールバー = 1 cm (左), 100 μm (右).

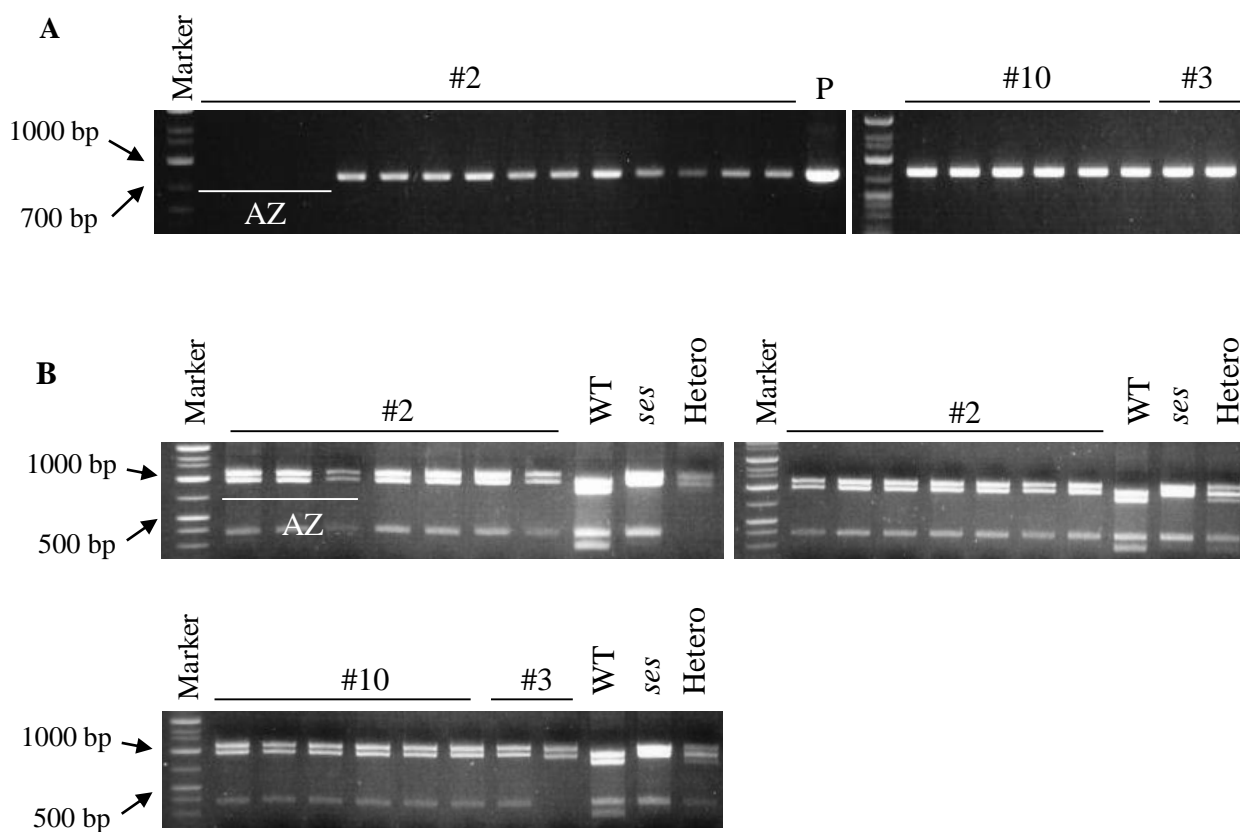


図2-18 *SES*-Whole組換えT1個体の選抜

3系統の*SES*-Whole組換えT1個体 (#2, #3, #10) を使用した.

A, NTPII-Marker (表1-1) を用いた導入遺伝子の有無の確認.

B, *SES*-Marker (表2-6) を用いた*ses*変異の遺伝子型の確認.

AZ, アザイガス; P, 組換えに使用したプラスミドベクター (ポジティブコントロール).

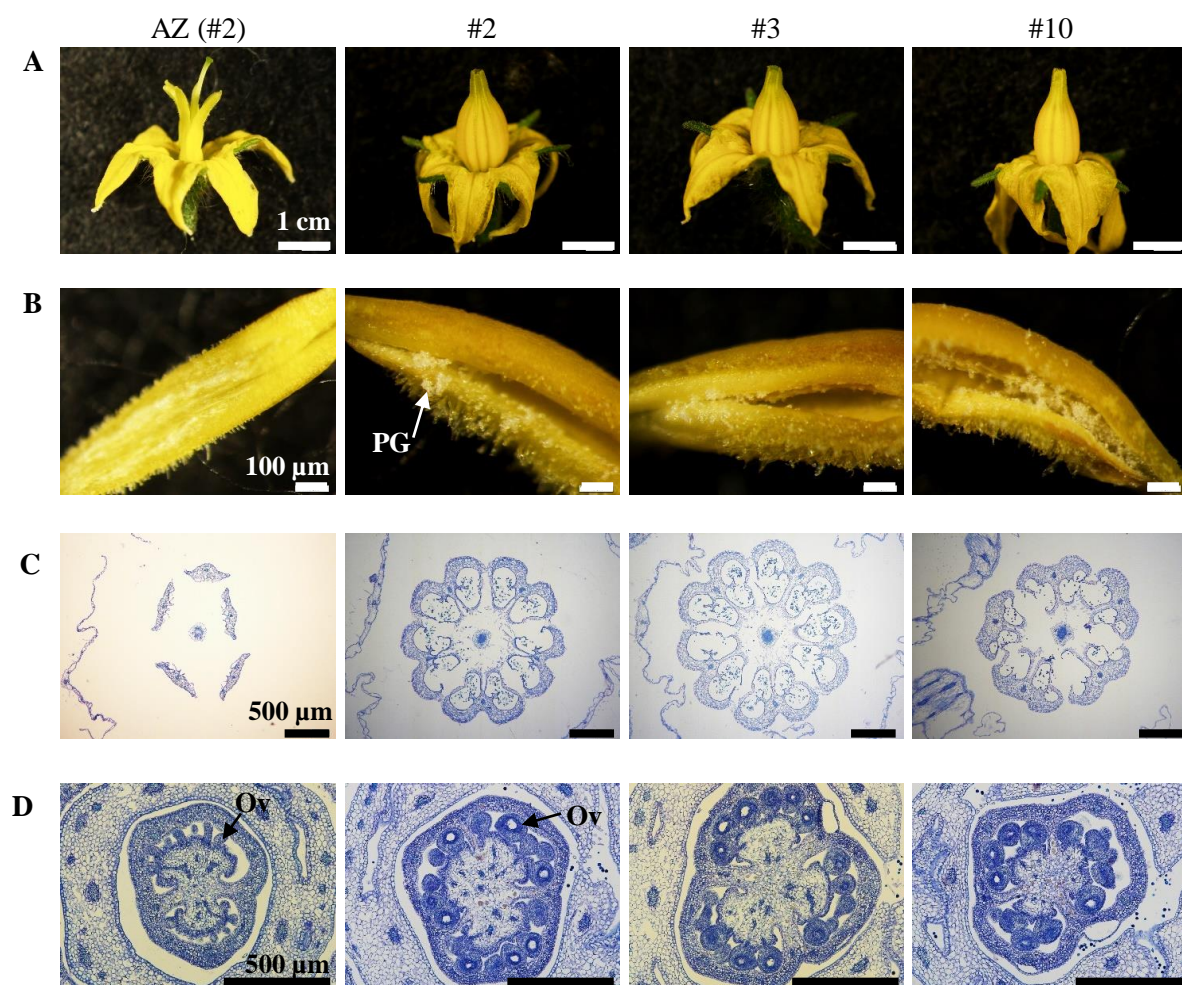


図2-19 *SES-Whole*組換えT1個体の花器官の比較

左からアザイガス (AZ) 個体 (#2系統), 組換え遺伝子を持つ#2, #3, #10系統.

A, 開花期の花器の全体. スケールバー = 1 cm.

B, 開花期の葯と花粉. スケールバー = 100 μ m.

C, 開花期葯の横断切片. スケールバー = 500 μ m.

D, 開花期子房の横断切片. スケールバー = 500 μ m.

Ov, ovule 胚珠; PG, pollen grain 花粉.

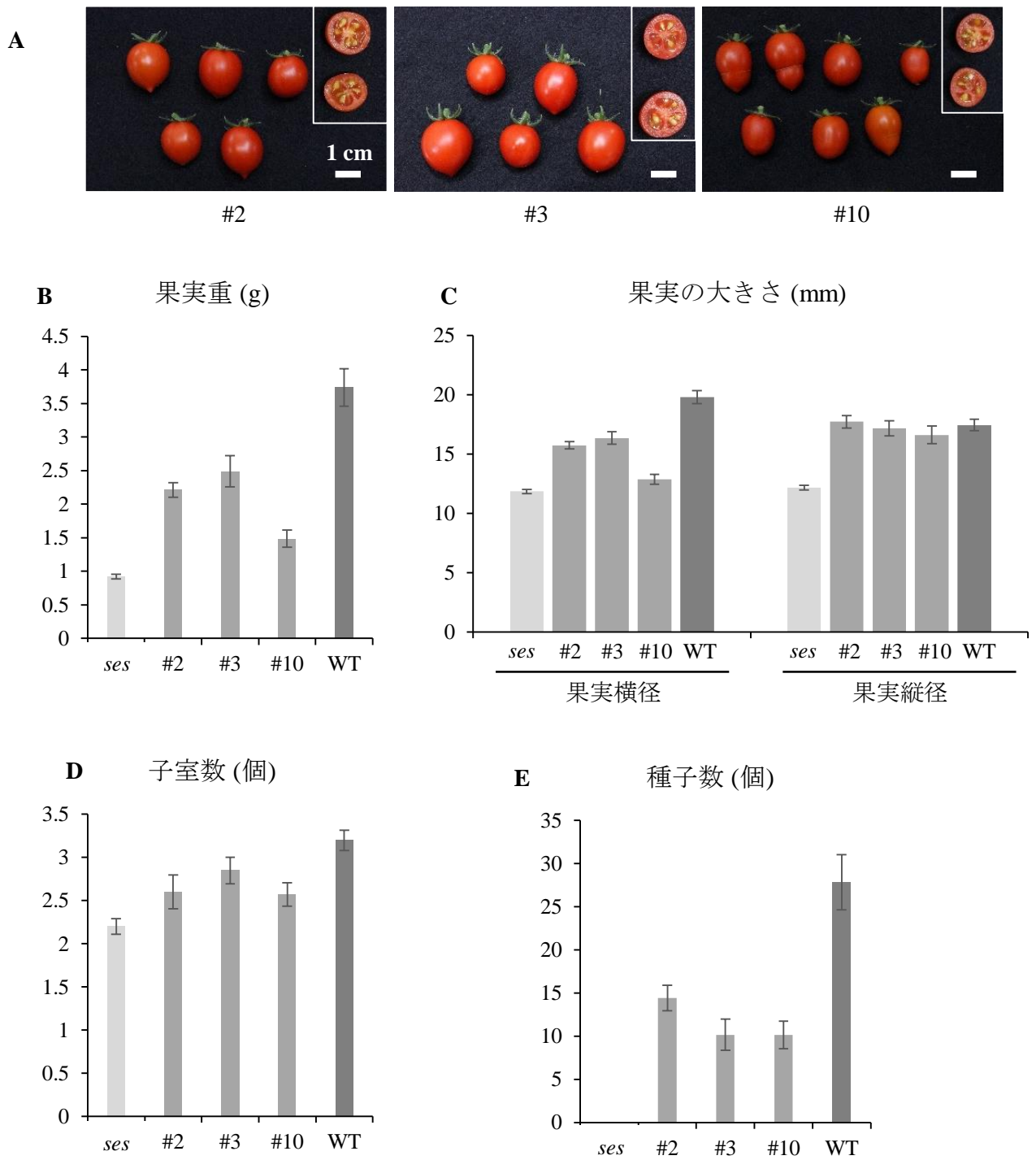


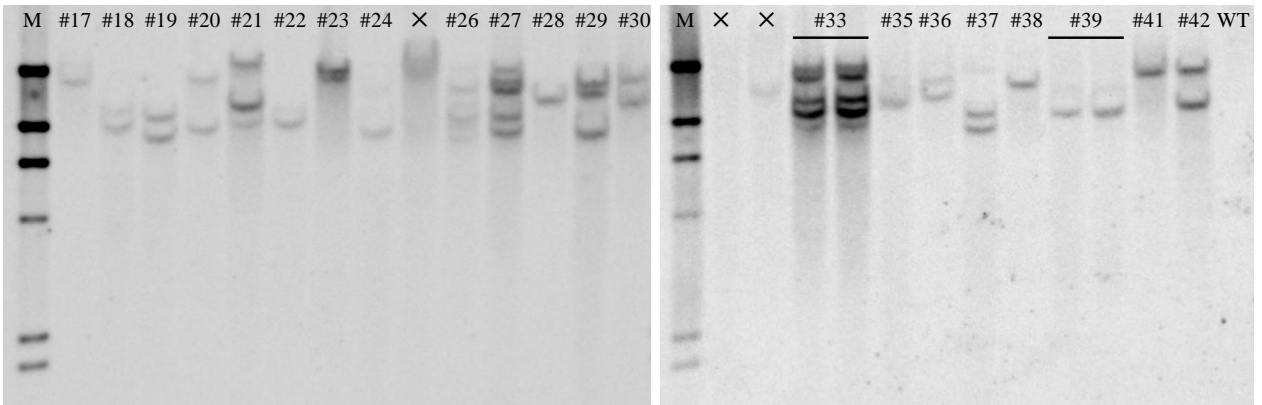
図2-20 *SES-Whole*組換えT1個体の果実の比較

A, 赤熟果実とその横断面. *SES-Whole*左から組換え系統#2, #3, #10. スケールバー = 1 cm.

B, 果実重; C, 果実横径と果実縦径; D, 果実横断面にみられる子室数; E, 1果実あたりの種子数

N ≥ 13; エラーバー = 標準誤差 (SE).

A



B

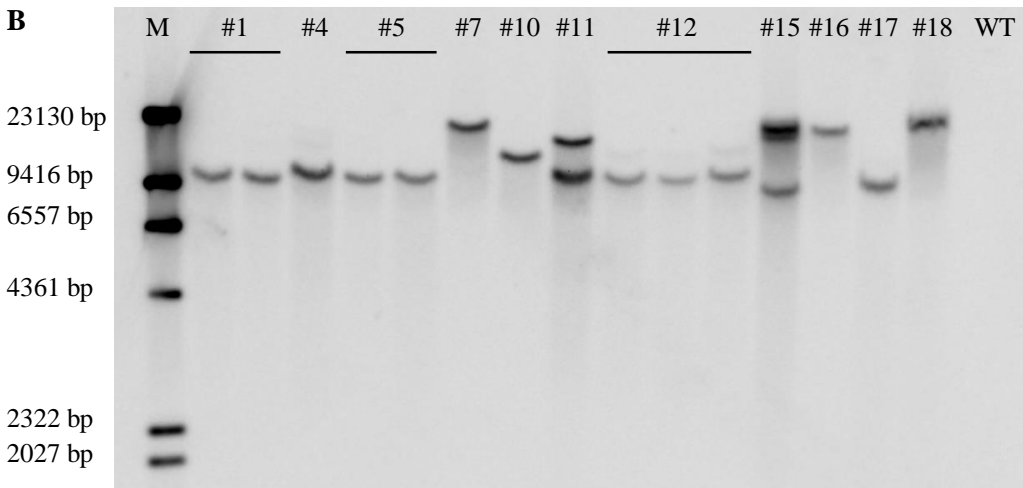
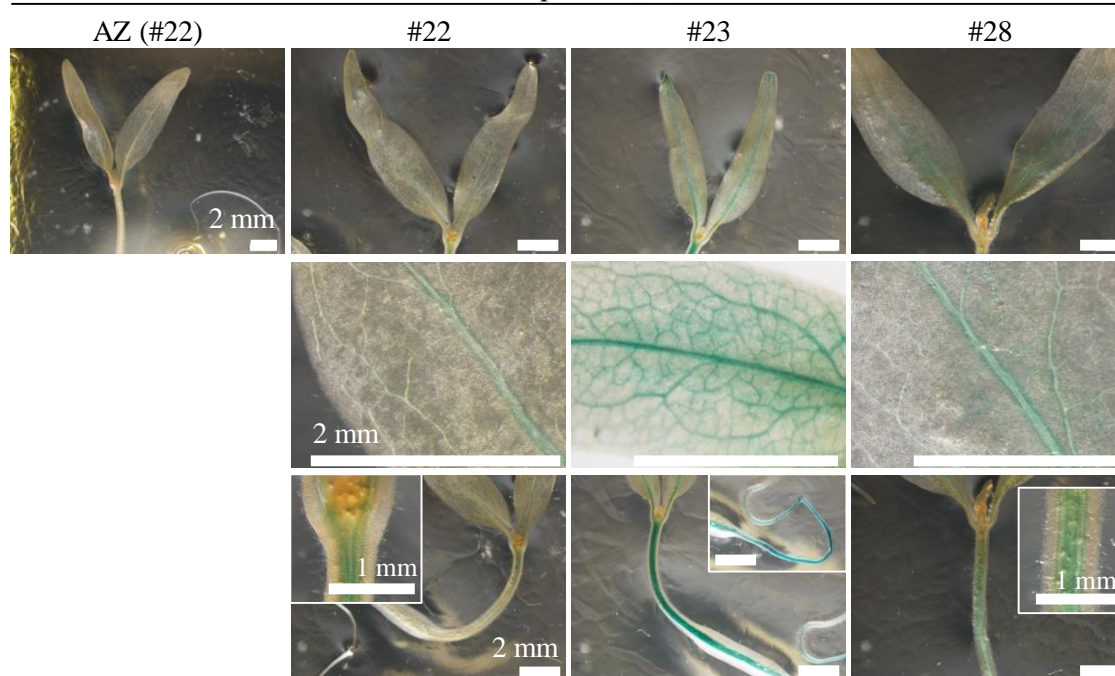


図2-21 *SESp-GUS*組換え体および*SESpt-GUS*組換えT0個体のサザンブロット解析
解析には組換えT0個体より抽出したゲノムDNAを使用した。

A, *SESp-GUS*組換え体
B, *SESpt-GUS*組換え体
M, 分子量マーカー。

A

SESp-GUS (T2)



B

SESpt-GUS (T2)

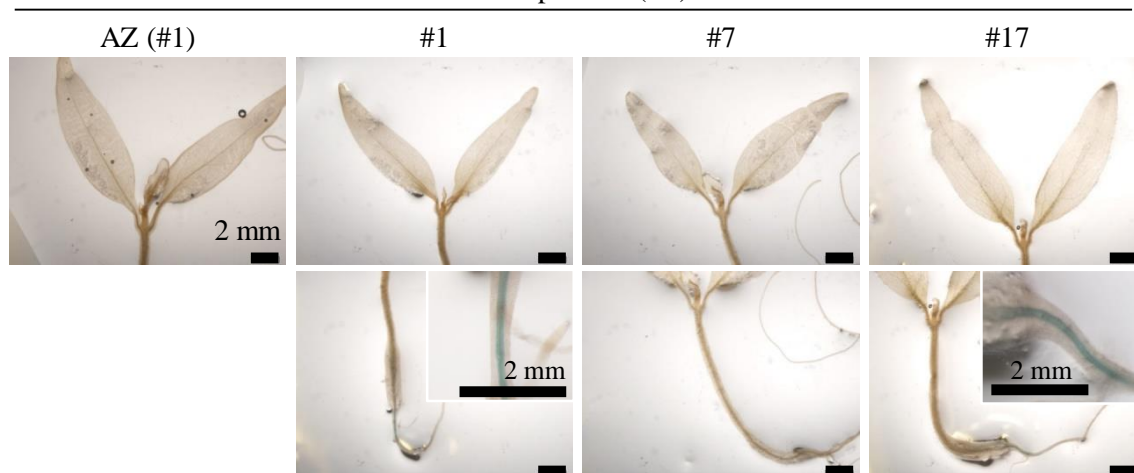


図2-22 GUS発現組換え体の幼苗のGUS染色

A, *SESp-GUS*組換え体 (T2個体). 上段, 子葉; 中段, 子葉拡大図; 下段, 胚軸. 左から#22系統のアザイガス (AZ) 個体, #22ホモ個体, #23ホモ個体, #28ホモ個体.

B, *SESpt-GUS*組換え体 (T2個体). 上段, 子葉; 下段, 胚軸. 左から#1系統のアザイガス (AZ) 個体, #1ホモ個体, #7ホモ個体, #17ホモ個体.

スケールバー = 2 mm (1部1 mm). AZ, アザイガス.

SESp-GUS

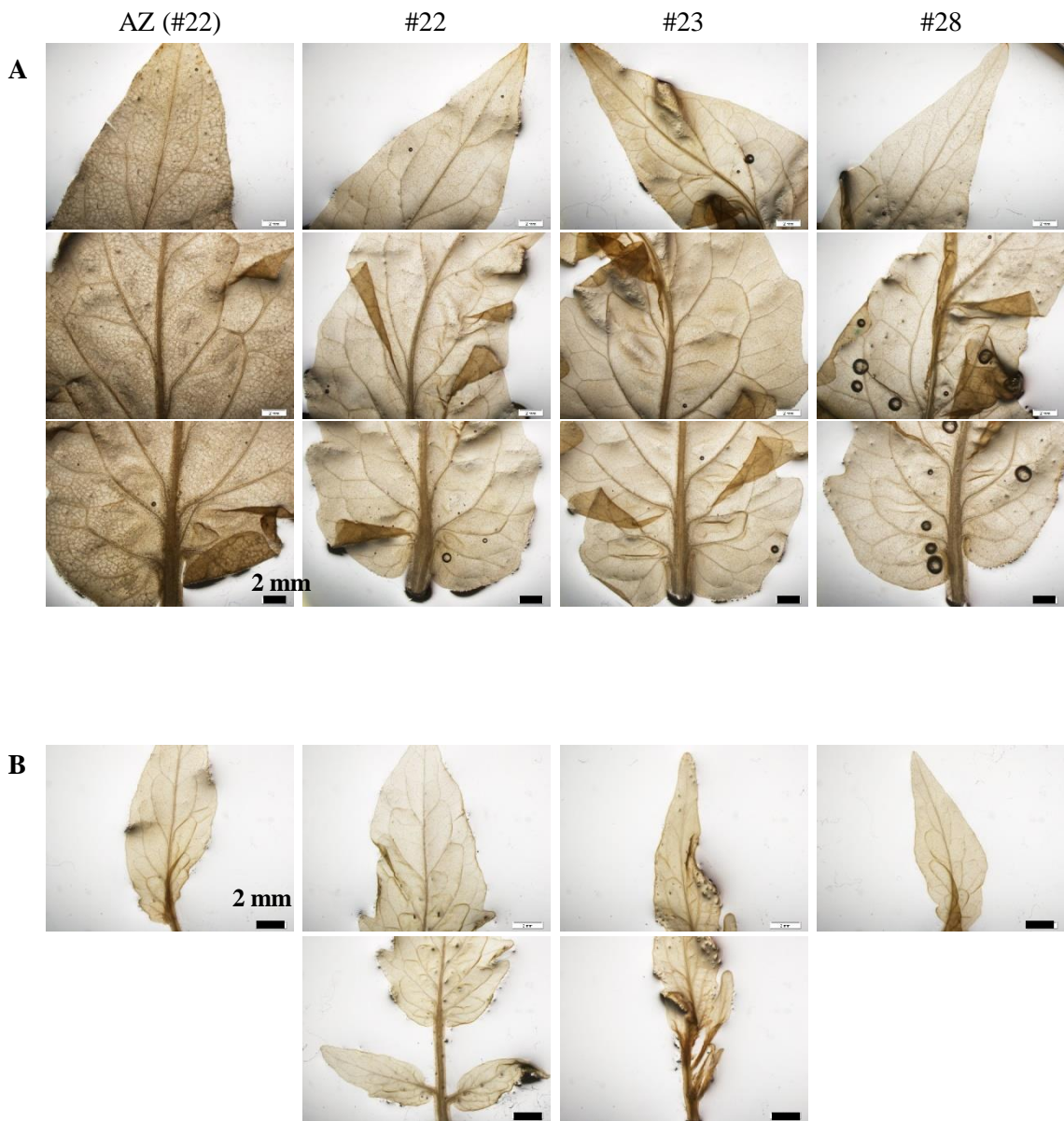


図2-23 GUS発現組換え体の葉のGUS染色

A, SESP-GUS組換え体の成熟葉.

B, SESP-GUS組換え体の未熟葉.

左から#22系統のアザイガス (AZ) 個体, #22ホモ個体, #23ホモ個体, #28ホモ個体.

スケールバー = 2 mm. AZ, アザイガス.

SESpt-GUS

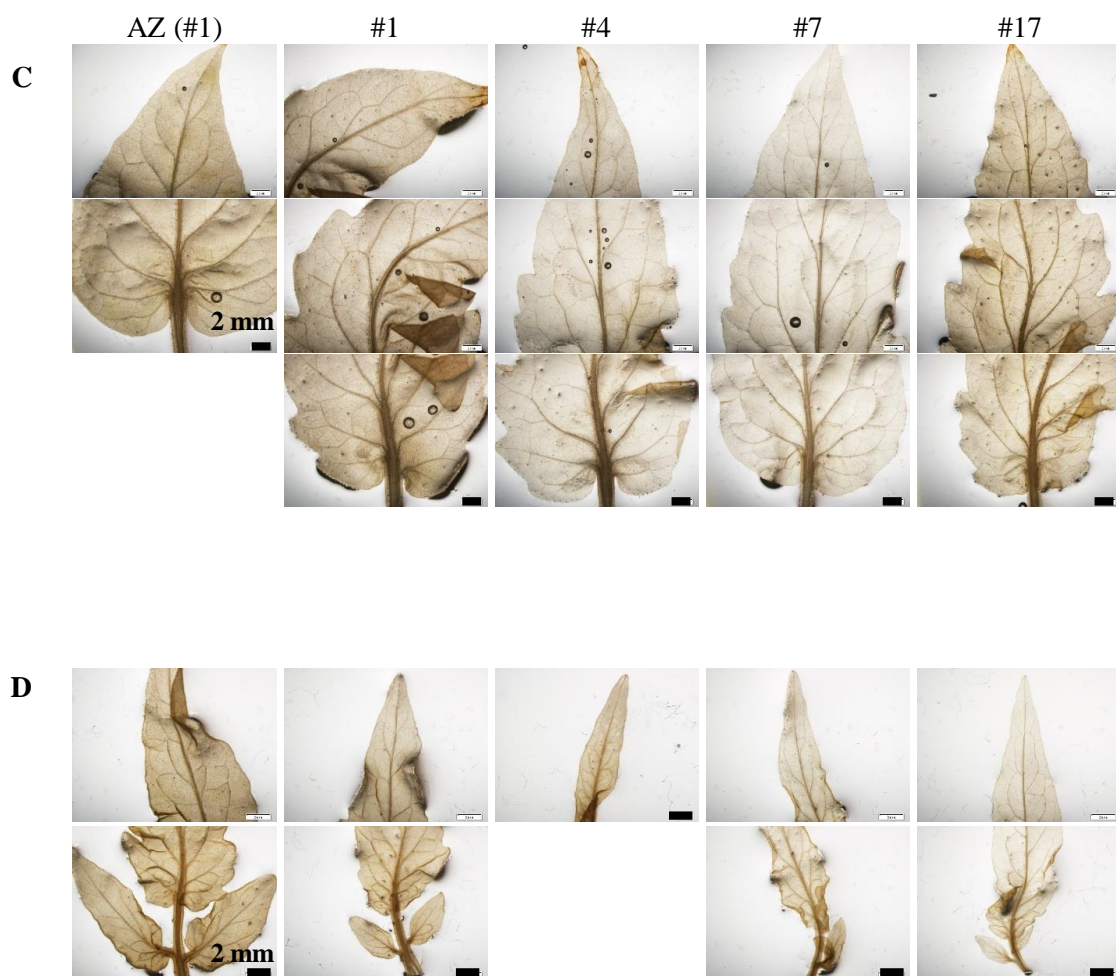


図2-23 GUS発現組換え体の葉のGUS染色

C, *SESpt-GUS*組換え体の成熟葉.

D, *SESpt-GUS*組換え体の未熟葉.

左から#1系統のアザイガス (AZ) 個体, #1ホモ個体, #4ホモ個体, #7ホモ個体, #17ホモ個体.

スケールバー = 2 mm. AZ, アザイガス.

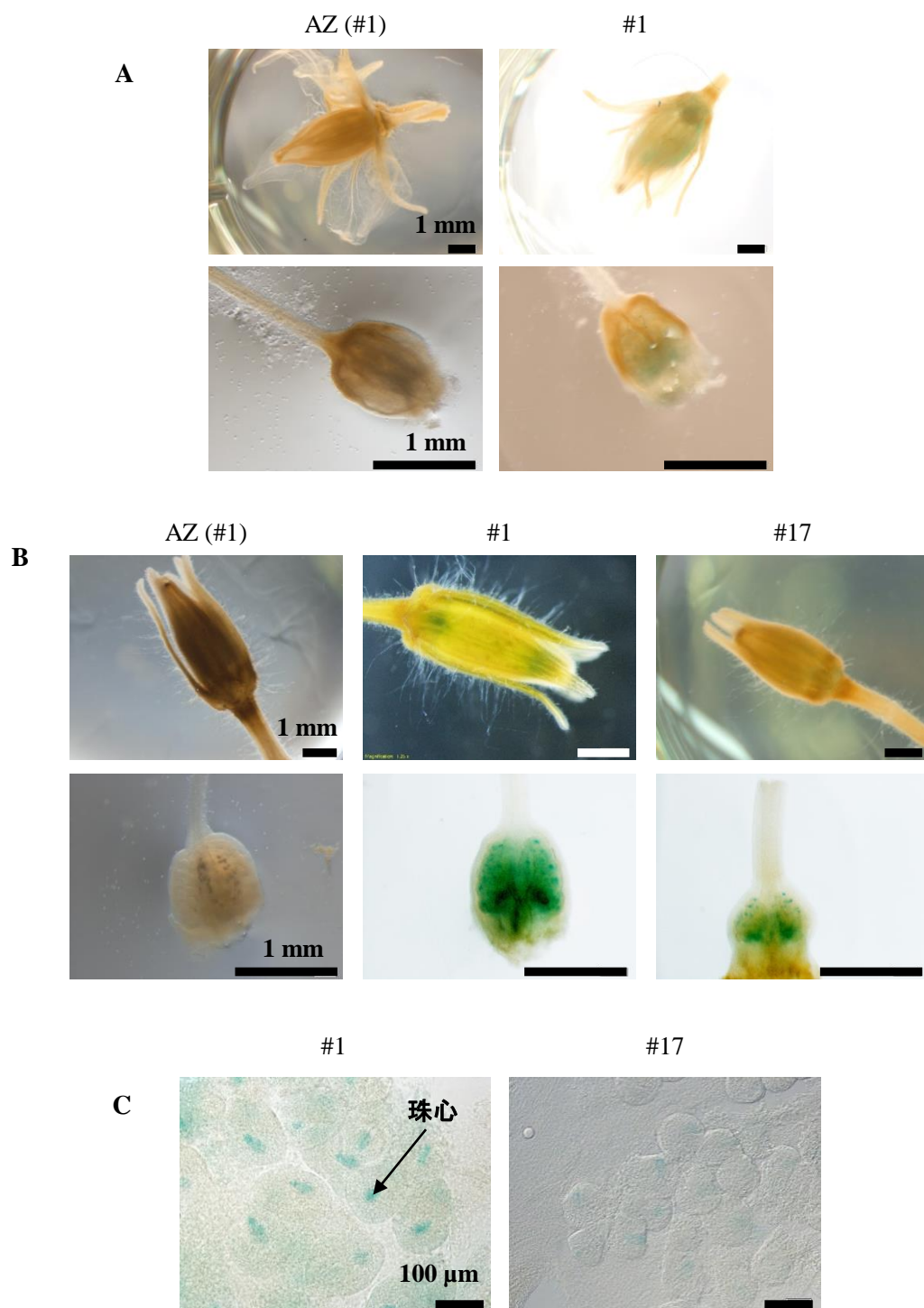


図2-24 *GUS*発現組換え体の開花期花器およびつぼみの*GUS*染色
 A, *SESt*-*GUS*組換え体における開花期の花器全体(上段)とその雌蕊(下段). スケールバー = 1 mm.
 B, *SESt*-*GUS*組換え体における縦径2-3 mm のつぼみ全体(上段)とその雌蕊(下段). スケールバー = 1 mm.
 C, *SESt*-*GUS*組換え体における胚珠の光学顕微鏡による観察.スケールバー = 100 μm .
 AZ, アザイガス.

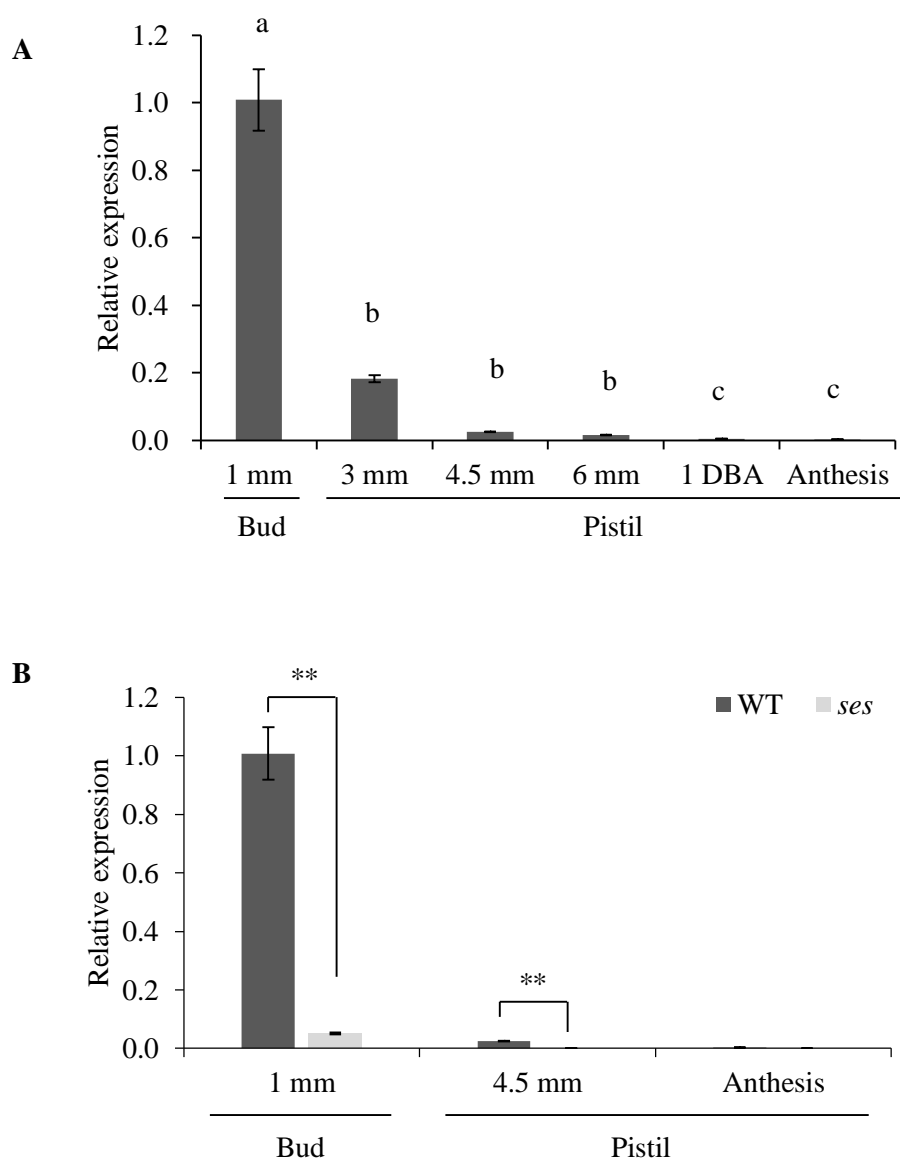


図2-25 発達段階別の雌蕊およびつぼみにおけるSESの発現量の比較

縦径1 mmのつぼみ全体と縦径3 mm, 4.5 mm, 6 mmそして開花1日前のつぼみおよび開花日の花器から採取した雌蕊より合成したcDNAを使用した。

A, 野生株におけるSESの発現量。

N = 3. エラーバー = 標準誤差 (SE). 異なるアルファベット間で有意差あり (Tukey-Kramer法; $P < 0.01$).

B, *ses*変異体との発現量の比較。

N = 3. エラーバー = 標準誤差 (SE). アスタリスクはT検定による有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

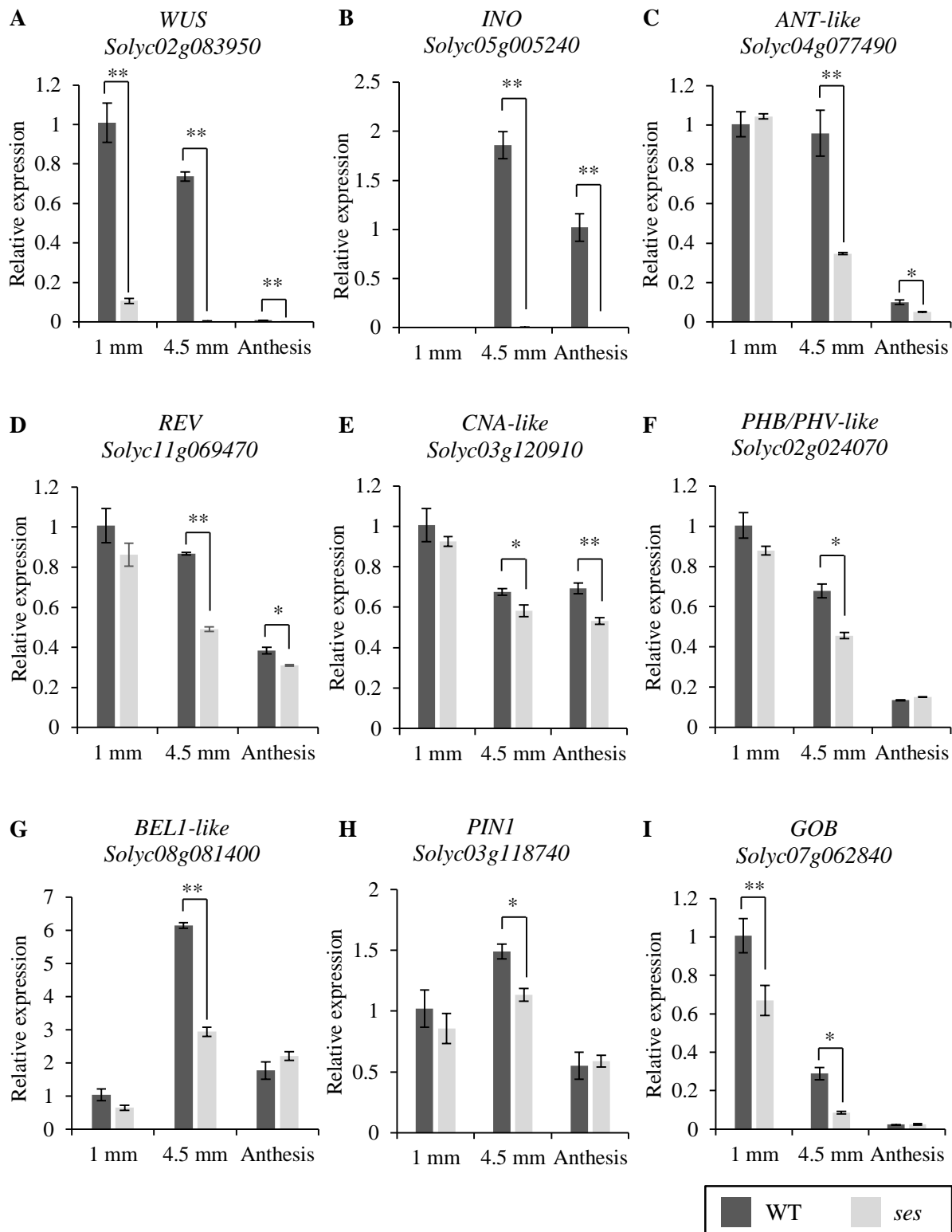


図2-27 WTと*ses*変異体の心皮および胚珠形成に関与する遺伝子の発現の比較
A, *WUS*; B, *INO*; C, *ANT-like*; D, *REV*; E, *CAN-like*; F, *PHB/PHV-like*; G, *BEL1-like*; H, *PIN1-like*; I, *GOB*.

N = 3. エラーバー = 標準誤差 (SE). アスタリスクはT検定による有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). 1 mmはつぼみ全体から、4.5 mmとAnthesisはその大きさ (ステージ) のつぼみ, もしくは花器より採取した雌蕊から合成したcDNAを使用した.

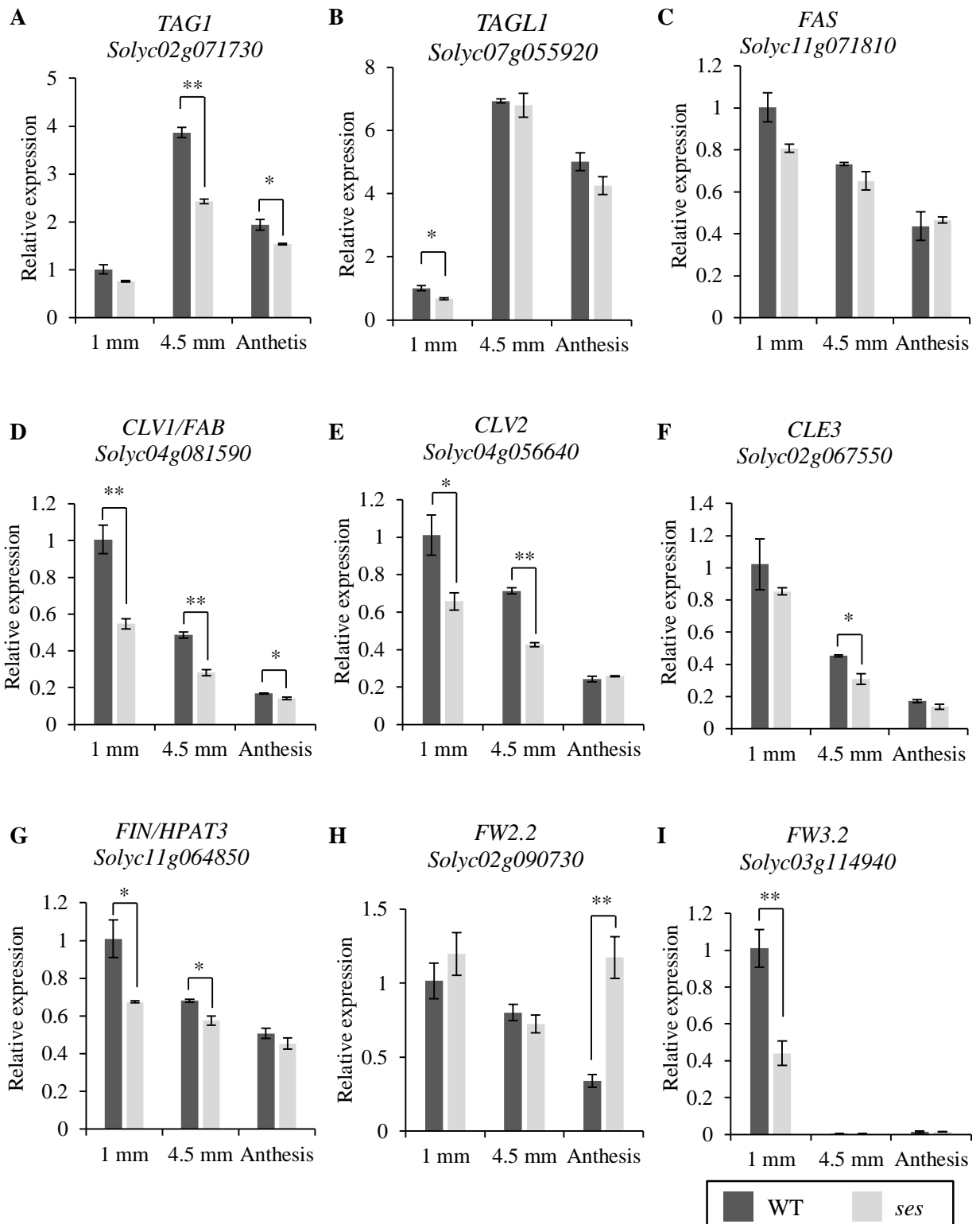


図2-28 WTと*ses*変異体の心皮の形成と果実肥大性に関与する遺伝子の発現の比較
A, *TAG1*; B, *TAGL1*; C, *FAS*; D, *CLV1/FAB*; E, *CLV2*; F, *CLE3*; G, *FIN/HPAT3*; H, *FW2.2*; I, *FW3.2*.

N = 3. エラーバー = 標準誤差 (SE). アスタリスクはT検定による有意差があることを示す (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). 1 mmはつぼみ全体から、4.5 mmとAnthesisはその大きさ (ステージ) のつぼみ、もしくは花器より採取した雌蕊から合成したcDNAを使用した。

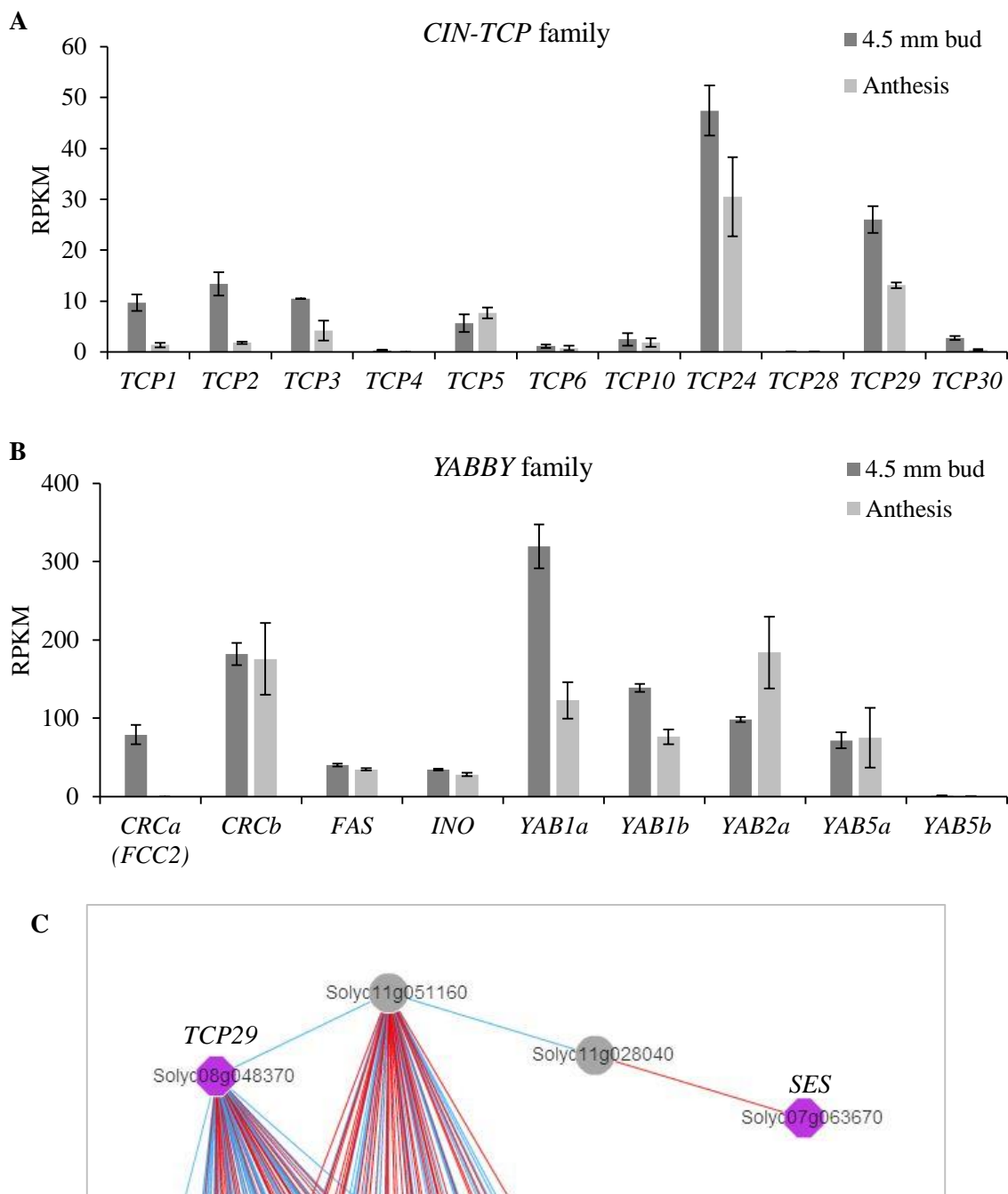
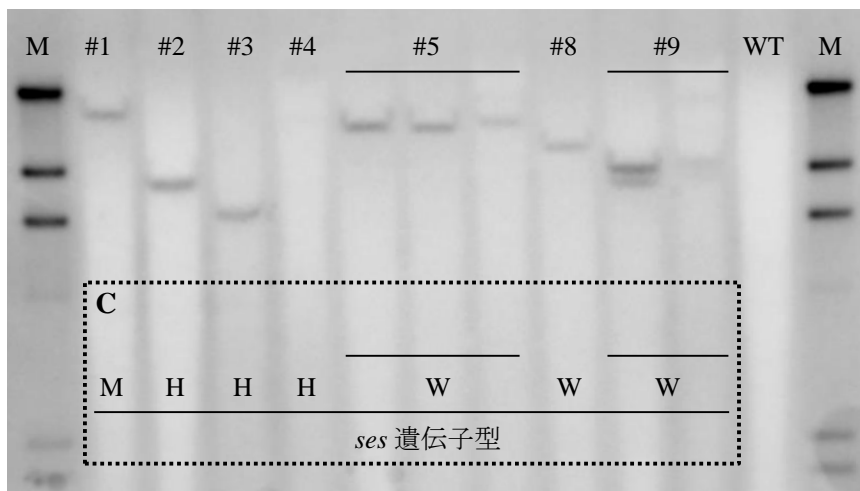


図2-29 WT雌蕊における*CIN-TCP family*および*YABBY family*遺伝子の発現の比較
 4.5 mmのつぼみおよび開花期花器から採取した雌蕊より合成したcDNAを使用した。
 A, *CIN-TCP family*遺伝子の発現の比較
 B, *YABBY family*遺伝子の発現の比較
 N = 3, エラーバー = 標準誤差 (SE).
 C, TomExpressを用いた*SES*と*TCP29*の共発現解析
 赤線は正の相関, 青線は負の相関があることを示す.

A



B

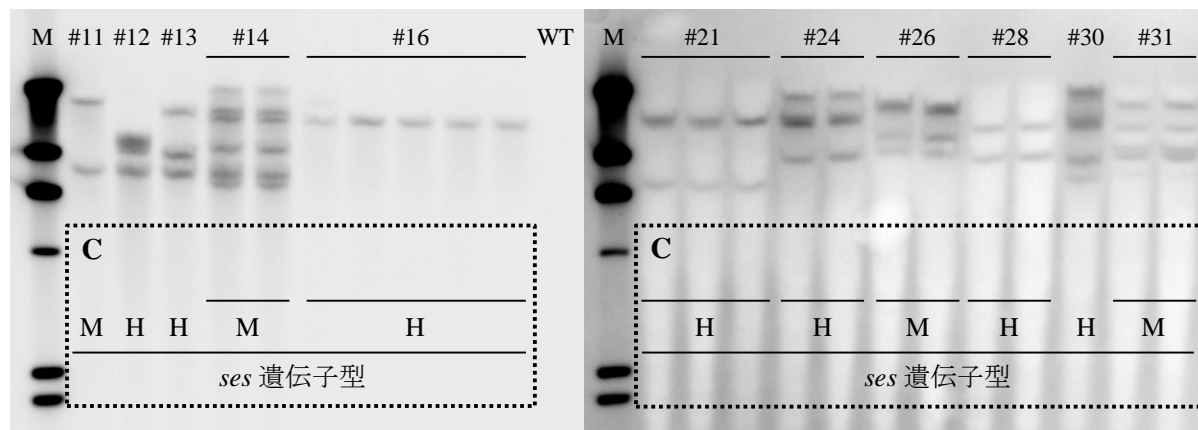


図2-30 *SESpt-FCC2-EAR*および*SESpt-TCP29-EAR*組換えT0個体のサザンブロット解析
解析には組換えT0個体より抽出したゲノムDNAを使用した.

A, *SESpt-FCC2-EAR*組換えT0個体; B, *SESpt-TCP29-EAR*組換えT0個体

*ses*変異体のHE個体から得られた種子を播種し, その子葉を感染に使用した. サザンブロット解析には組換えT0個体のゲノムDNAを使用した. M, 分子量マーカー.

C, DNAマーカーによる*ses*の遺伝子型の確認

H, ヘテロザイガス型を示した個体; M, 変異型を示した個体; W, 野生型を示した個体.

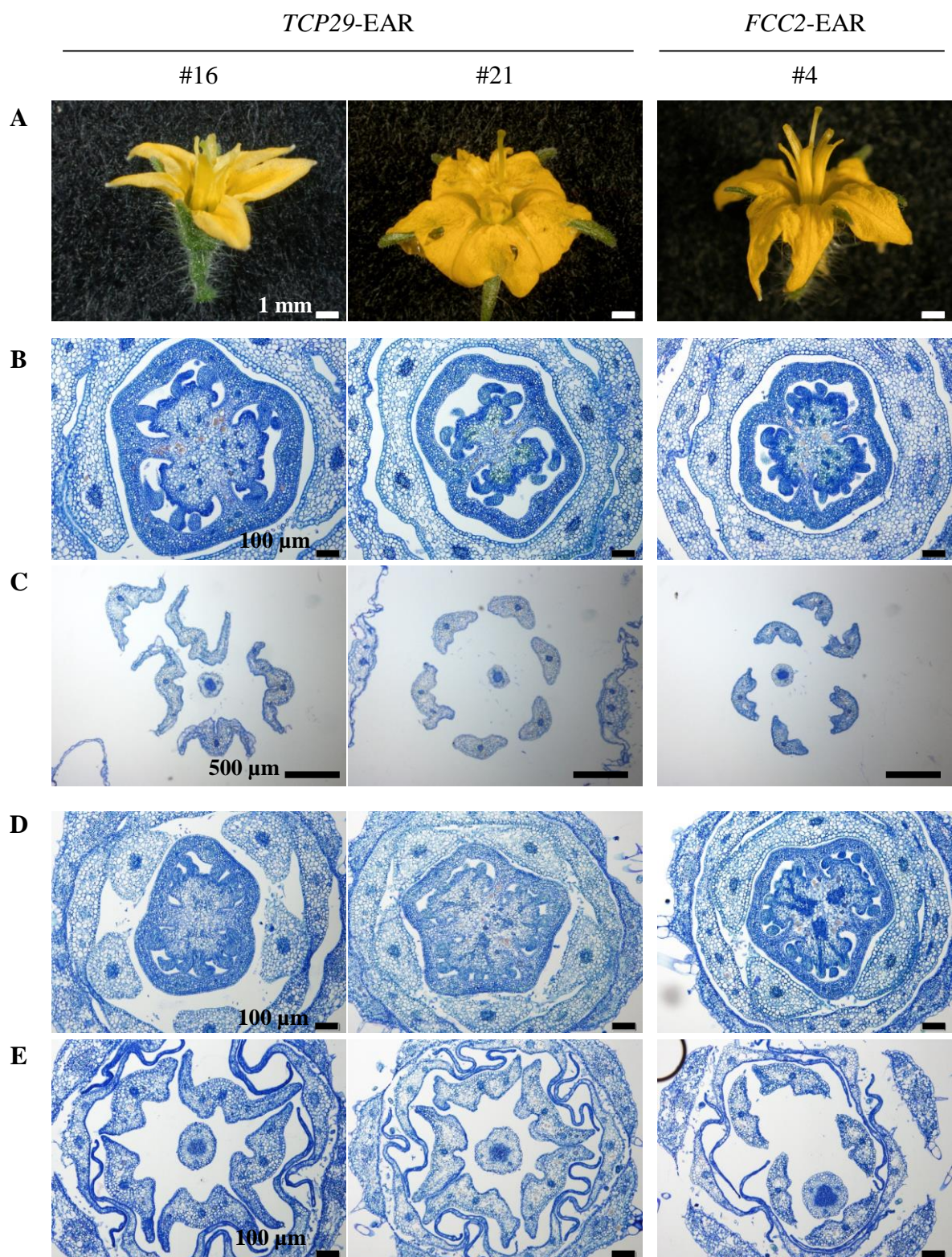


図2-31 *SESpt-TCP29-EAR*および*SESpt-FCC2-EAR*組換えT1個体の花器官の比較

A, 開花期の花器. スケールバー = 1 mm.

B, 開花期の子房の横断面. スケールバー = 100 μ m.

C, 開花期の葯の横断面. スケールバー = 500 μ m.

D, 縦径3-4 mmのつぼみにおける子房の横断面. スケールバー = 100 μ m.

E, 縦径3-4 mmのつぼみにおける葯の横断面. スケールバー = 100 μ m.

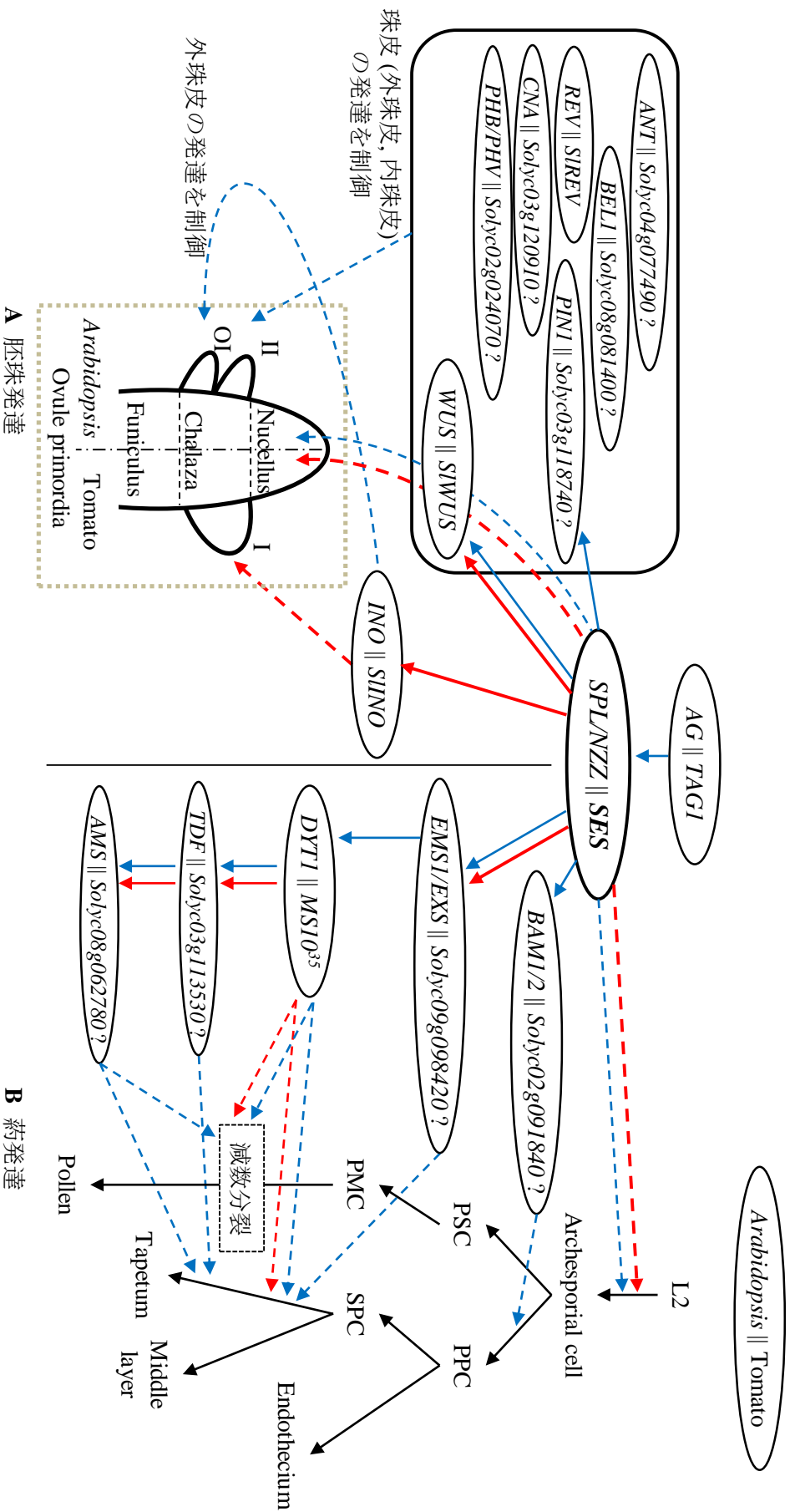


図2-32 SESによる胚珠および葯の発達制御のモデル

A, 胚珠発達の制御モデル。I, integument 珠皮; II, inner integument 内珠皮; OI, outer integument 外珠皮

B, 葯発達の制御モデル。PMC, pollen mother cells 花粉母細胞; PPC, primary parietal cells 一次側膜細胞; PSC, primary sporogenous cells 一次孢子形成細胞; SPC, secondary parietal cells 二次側膜細胞。

— 矢印はシロイヌナズナで, 赤矢印はトマトで誘導されることを示す。

総合考察

雌蕊および心皮の形態形成は果実発達の初期段階であり、かつ最終的な果実形態にも影響を与える重要なポイントである。そこで、雌蕊および心皮の形成に着目し、その形態形成メカニズムを明らかにすることを目的とした研究を行った。トマトの雌蕊および心皮の形成に関する新しい知見を得るためには、トマト変異体を用いた正遺伝学が有効と考え、筑波大学で作出および管理しているトマト ‘Micro-Tom’ 変異体集団より、雌蕊形態に変異のみられる変異体を 2 つ選抜し解析を行った。選抜された変異体、*fcc2* 変異体と *ses* 変異体の形態学的解析や遺伝学的解析はすでに実施されており (羽尾, 修士論文 2014), 本研究では、選抜された原因遺伝子候補の相補性検定とその遺伝子の詳細な解析を実施した。

先行研究において、マップベースクローニングおよび変異体の全ゲノムシーケンス解析により、*fcc2* 変異体は *Solyc01g010240 (FCC2/CRCa)* が、*ses* 変異体は *Solyc07g063670 (SES)* が原因遺伝子候補として単離されている (羽尾, 修士論文 2014)。初めに、RNAi 法を用いて *FCC2/CRCa* の発現抑制組換え体を作成した。その結果、*FCC2/CRCa* とそのパラログ遺伝子である *CRCb (Solyc05g012050)* の 2 つの遺伝子発現が抑制された個体を獲得し、その個体は多重に重なった心皮から雌蕊を形成した。その *FCC2-RNAi* 組換え個体が *fcc2* 変異体と類似した表現型を示したため、単離された遺伝子 *FCC2/CRCa* は *fcc2* 変異体の原因遺伝子である可能性が高い。また、2 つのトマト *CRC* 遺伝子が抑制されている組換え体系統で表現型が顕著にみられたことから、2 つのトマト *CRC* 遺伝子は類似した機能を持っており、互いにその機能を補完し合っていると考えられる。さらに、*FCC2-RNAi* 組換え体は雌蕊形成時における心皮の形成が過剰になり、その過剰な心皮形成により、花芽分裂組織様の成長点を有する果実様組織を形成した (図 1-11)。そして、その成長点からは心皮様の組織が形成されていたため、トマト *CRC* は雌蕊形成時に心皮の形成を負に制御し、心皮の枚数および雌蕊の形態を決定している遺伝子であると示唆される。一方、*ses* 変異体の原因遺伝子候補においても、*fcc2* 変異体同様 RNAi 組換え個体を作成したが、十分に *ses* 変異体様の表現型を示す組換え個体を得ることができなかった。また、*ses* 変異体と同一の原因遺伝子を持つ *ses2* 変異体も、*ses* 変異体同様 *SES* 遺伝子にストップコドンを生じる変異を保持していた (図 2-7)。よって、*SES* は少量の発現量であってもその機能を発揮し、下流の遺伝子発現を制御することで、稔性のある胚珠および花粉を誘導できると示唆される。次に、*SES* 遺伝子の全長を導入した組換え体を作成し、導入遺伝子を持ち、かつ *ses* 変異をホモで有する組換え

個体が WT 型の表現型に回復した組換え個体を獲得することができた (図 2-19, 2-20). この結果より, 単離された遺伝子は *ses* 変異体の原因遺伝子であることが証明された. さらに, *SES* の過剰発現体の作出を試みたが, 過剰発現を示す組換え個体は獲得できなかった. シロイヌナズナにおいても *EAR* モチーフを持つ遺伝子の過剰発現体の作出は困難であることから (Tsutsui et al., 2009; Pan et al., 2010), *SES* の *EAR* モチーフもシロイヌナズナ同様転写抑制のモチーフとしての機能を保持している可能性が高い (Wei et al., 2015).

発現解析を行った結果, *FCC2/CRCa*, *SES* 共に花芽形成初期 (縦径 1 mm 以下のつぼみ) で発現が高くステージが進むにつれて発現は減少した. さらに, GUS 染色で詳細な発現部位を調査した結果, 雌蕊の形成ステージにおいて *FCC2/CRCa* は主に雌蕊形成初期の子房壁で, *SES* は主に雌蕊形成初期の胚珠の珠心で発現していることが分かった. このことより, *FCC2* および *SES* は花芽形成においてピンポイントで発現することで雌蕊形成を制御している可能性が高いことが分かった. また, シロイヌナズナにおいて *CRC* は *AG* および *LFY* によって発現の制御を受けると報告されており (Gómez-Mena et al., 2005; Lee et al., 2005), *SPL/NZZ* は *AG* によって発現が誘導されると報告されている (Ito et al., 2004). 本研究において, トマト *FCC2/CRCa* および *CRCb* も, そのプロモーターおよびターミネーター領域に *AG* と *LFY* の認識配列を持ち, *SES* も *AG* の認識配列を持つことが判明した (図 1-4, 図 2-4). 従って, *FCC2/CRCa* および *SES* はシロイヌナズナと類似した発現制御を受けている可能性が高い.

そして, *fcc2* 変異体および *FCC2-RNAi* 組換え個体のつぼみおよび雌蕊で, *TOMATO AGAMOUS LIKE11 (TAGL11)* と *MADS BOX PROTEIN3 (MBP3)* の遺伝子発現が有意に減少していた (図 1-18CD). これらの遺伝子はシロイヌナズナにおいて, 花芽形成の ABC モデルにおける胚珠の形成を制御する D クラス遺伝子のオーソログであり, E クラス遺伝子と複合体を形成することで心皮の形成を抑制し, 胚珠の形成を誘導することが分かっている (Brambilla et al., 2007; Leseberg et al., 2008; Ocares and Mejía, 2016). その一方, トマト C クラス遺伝子の *TAG1* と *TAGL1*, およびトマト E クラス遺伝子の *TOMATO MADS box 5 (TM5)* と *TM29* の発現レベルの大きな減少は確認されなかった (図 1-18ABEF). 従って, *fcc2* 変異体および *FCC2-RNAi* 組換え個体の過剰な心皮形成は, WT に比べて花芽形成の ABC モデルにおける, C クラス遺伝子と E クラス遺伝子の複合体 (心皮形成誘導) の割合が高く, D クラス遺伝子と E クラス遺伝子の複合体 (心皮形成抑

制, 胚珠形成誘導) の割合が低くなっていることに起因している」と示唆される (図 1-20). 雌蕊形成において, 心皮形成ステージから胚珠形成ステージへの移行は配偶子形成においてとても重要であるが, その分子メカニズムは未解明な部分が大きかった. 本研究により, *TAG1* (トマト C クラス遺伝子) および *LFY* によって発現誘導を受けた *CRC* がトマト D クラス遺伝子の発現を誘導し, 心皮形成から胚珠形成のステージへ移行させていると示唆された. シロイヌナズナやポピー, エンドウにおいて *CRC* の機能欠損株が胚珠形成を阻害することが報告されている (Bowman and Smyth, 1999; Orashakova et al., 2009; Fourquin et al., 2014). 従って, 本研究で示された *CRC* による胚珠形成ステージへの移行 (D クラス遺伝子の発現誘導) は植物で広く保存されていると考えられる. また, これまでに報告されているトマトやシロイヌナズナにおいて心皮の形成が増える変異体は, 花芽分裂組織のサイズが大きくなり, 心皮形成部位が増えることに起因していた (Szymkowiak and Sussex, 1992; Cao et al., 2015; Fernández-Lozano et al., 2015; Landau et al., 2015). 本研究ではこれまでに多重に心皮が形成される新しい変異体を用いることで, 花芽分裂組織のサイズに依存しない新しい心皮の形成メカニズムを明らかにすることができた. この *CRC* による発現制御と心皮形成のメカニズムはシロイヌナズナにおける研究でも言及されていない新しい発見である. そのため, 本研究で得られたこの新しいメカニズムは, 植物全般に保存されているのか, トマトのみでみられるものなのか解明する必要がある.

さらに, *ses* 変異体はつぼみおよび雌蕊発達初期において *WUSCHEL (WUS)* と *INNER NO OUTER (INO)* の発現が有意に減少した (図 2-27AB). さらに, 縦径 1 mm 以下のつぼみで *Tomato Male Sterile 10³⁵ (MS10³⁵)* と *EXCESS MICROSPOROCYTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELL-like^a (EMS1/EXS-like^a)* の発現が有意に減少した (図 2-26AD). *WUS* は胚珠の発達に重要な遺伝子であり, シロイヌナズナの *spl/nzz* 変異体でも *WUS* の発現は低下し, 珠心の発達が阻害された (Schieffthaler et al., 1999; Groß-Hardt et al., 2002). よって, 胚珠形成において *SES* および *SPL/NZZ* は *WUS* の遺伝子発現を誘導するために必要であると示唆される (図 2-32). 一方, シロイヌナズナの *spl/nzz* 変異体では *INO* の遺伝子発現は低下せず, 珠皮も WT 同様に形成された (Balasubramanian and Schneitz, 2002). その反面, トマト *ses* 変異体においては珠皮が全く形成されていなかった (図 2-6). 従って, 一枚の珠皮から胚珠を形成するトマトと二枚の珠皮 (内珠皮, 外珠皮) から胚珠を形成するシロイヌナズナで, 異なる制御メカニズムがある」と示唆される. さ

に、外珠皮形成を制御している *INO* の発現がなくなったことでトマトにおける心皮形成が停止したことから、トマトにおける一枚の珠皮はシロイヌナズナの外珠皮に近い性質を持っていると考えられる。トマトとシロイヌナズナで胚珠の発達パターンが異なるように、植物種ごとに様々な胚珠の発達様式がみられる (Endress, 2011)。珠皮の枚数もその多様性の一つであり、キンポウゲ科 (*Ranunculaceae*) やサクラ属 (*Prunus*) は同じ科や属の中でも珠皮の枚数が異なることが報告されている (Wang and Ren, 2008; Lora et al., 2015)。このように、珠皮の発達様式は植物の進化や分類において重要な点であり、様々な植物種における胚珠の発達様式とそれに関与する遺伝子の解析が今後注目される考えられる。

また、*MS10³⁵* はシロイヌナズナの *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* のホモログ遺伝子であり、*MS10³⁵* と *DYT1* は PMC の減数分裂とタペート組織の形成に関与することが分かっている (Zhang et al., 2006; Jeong et al., 2014)。*EMS1/EXS* はシロイヌナズナにおいて、葯形成の初期段階で胞原細胞の数を決定する遺伝子で、タペート組織と中間層の形成にも関与している (Canales et al., 2002; Zhao et al., 2002)。しかし、これまでにトマトにおいて *EMS1/EXS* のオーソログに関する報告はなされていない。つまり、本研究で遺伝子発現の減少が確認された *EMS1/EXS-like^a* は、トマトにおいて胞原細胞の数を制御する重要な遺伝子である可能性は高い。また、以上の様な発現の上位性はシロイヌナズナにおいても確認されているため、葯形成においてトマト *SES* はシロイヌナズナのオーソログ遺伝子 *SPL/NZZ* と同様の発現制御をしていると示唆される。このように、*SES* の欠損が胚珠および花粉の形成とそれに関与する遺伝子の発現を完全に崩壊させてしまうことから、トマトにおいて *SES* は配偶子形成に必要不可欠な遺伝子であることが分かった (図 2-32)。

本研究で作出した *FCC2-RNAi* 組換え個体は *FCC2/CRCa* と *CRCb* の 2 つの遺伝子の発現を抑制していた。つまり、*FCC2-RNAi* 組換え個体の表現型は 2 つのトマト *CRC* 遺伝子を抑制した表現型であるため、*FCC2/CRCa* および *CRCb* の持つ特異的な機能は未解明なままである (特に *CRCb*)。よって、それぞれの遺伝子を特異的に制御した組換え体、もしくは TILLING 等でそれぞれの変異体を単離することで、各遺伝子の詳細な機能が明らかになると期待される。また、本研究では作出に失敗したが、*FCC2/CRCa* および *CRCb* の過剰発現個体を作成することで、トマト *CRC* 遺伝子のさらなる知見が得られると期待される。さらに、本研究では *fcc2* 変異体および *FCC2-RNAi* 組換え個体でトマト

D クラス遺伝子 (*TAGL11*, *MBP3*) の発現が減少したが、トマト *CRC* がトマト D クラス遺伝子の発現を直接制御しているかどうかは確認できなかった。そして、*TAGL11* に関しては、その発現抑制個体において種子発達に異常がみられることが報告されているが (Ocares and Mejía, 2016), 心皮発達との関連性および *MBP3* の機能解析は報告されていない。そこで、本研究で明らかになったトマトの心皮形成の新しい分子メカニズムを確立するためには、D クラス遺伝子の発現抑制体を作出もしくは遺伝子欠損個体を単離し、*fcc2* 変異体と類似した表現型を示すか確かめる必要がある。このトマトの心皮形成の新しい分子メカニズムの詳細を明らかにすることができれば、トマトの心皮の数や雌蕊形態、さらにはトマト果実形態や果実肥大性を自在に制御できるようになると期待される。トマト果実は品種によって果肉の厚さや子室の数などの果実特性が異なっており、その用途に応じた果実の特性が求められる。果肉の厚さや子室の数は、大きく心皮の特性や数に依存しているため、心皮の形成メカニズムの解明は、トマト果実の果肉の厚さや子室の数の制御を可能にすると期待される。また、トマトはその生理障害の一つとして異常な果実形態を示す乱形果を形成することがある。その要因の一つとして花芽形成時の夜温が関連することが分かっており、品種間に差はみられるものの夜温が低いほど乱形果を形成する傾向にある (深澤ら, 1993; 太田ら, 2002)。乱形果は鬼花の様な異常な花器形態 (特に心皮, 雌蕊) を示す花が果実になった結果である。よって、本研究で明らかになった心皮形成に関与している遺伝子およびその分子ネットワークは乱形果の発生メカニズムを明らかにし、さらにその抑制につながると期待される。また、*CRC* はトマトやシロイヌナズナだけでなく多くの植物種に保存されている遺伝子であることが分かっている (図 1-3; 羽尾, 修士論文 2014; Han et al., 2015)。この制御メカニズムの解明は、他の果実形成作物の研究および育種に大きな影響を与えると考えられる。そして、イチゴやキク科植物などはシロイヌナズナやナス科植物とは異なり、一つの花に多数の雌蕊を形成する。これら植物の心皮, 雌蕊形態と *CRC* 遺伝子との関連性を解析すれば、様々な植物で心皮, 雌蕊の形態を決定している要因の解明につながると考えられる。

また、*SES* はトマトにおいて報告例の少ない配偶子形成に必要不可欠な遺伝子であり、さらに胚珠や花粉形成において形成の初期段階で働く重要な遺伝子であることが分かった。そして本研究において、*ANT-like*, *BEL-like*, *EMS1/EXS-like*^a などトマトにおいて報告のなかった遺伝子の単離および機能の推測に成功した。よって今後、*ses* 変異体を用い

た研究により、トマトの配偶子形成や稔性に関する研究がより進むと考えられ、さらにトマトの花粉形成や胚珠形成のメカニズムが解明されると期待される。さらに興味深いことに、研究のモデル植物であるシロイヌナズナと胚珠の珠皮形成に関して相違点があることが判明した。この相違点がトマトのみにみられる特異的な形質であるのか、単一の珠皮を形成する植物で共通に保存されている形質であるのかは明らかになっていない。この違いを明らかにすることは、トマトおよび植物における胚珠形成の進化の過程を解明することにつながると期待される。稔性はトマトの着果性に大きく影響を与え、トマト果実の種子の有無は果実品質に大きく影響を与えるため、より一層配偶子形成や稔性の研究が進むことを期待したい。そして、トマトの育種場面では開花前に除雄し、さらに花粉親の花粉を交配させるという作業が必須である。トマトの花粉形成や胚珠形成を制御できるようになれば、トマト育種にかかる手間が大きく減少すると期待される。さらに、 F_1 種子作成の親系統に雄性不稔の個体と姿勢不稔の個体を用いることで、自殖種子の混入のない F_1 種子の生産を可能にすると期待される。また、トマト *SES* における *EAR* モチーフの意義を明らかにすることができなかった。シロイヌナズナの知見により、転写抑制因子として働くことが示唆されるが、ルシフェラーゼアッセイ等で本当に転写抑制の能力があるか確かめる必要がある。さらに、*EAR* モチーフを欠失させた *SES* を発現させることで、生体内での *EAR* モチーフの役割を明らかにできると期待される。そして、本研究では *FCC2* および *TCP29* に *EAR* モチーフを結合させたタンパク質を *ses* 変異体で発現させたが、*WT* の表現型に回復はしなかった (図 2-)。シロイヌナズナにおいては *YABBY* および *TCP* タンパク質と *SPL/NZZ* が複合体を形成することが示されているが (Sieber et al., 2004b; Wei et al., 2015)、トマトにおいては未だ示されていないので、まずはトマト *SES* が生体内でどのタンパク質と相互作用するのかを調べる必要がある。この *SES* および *SPL/NZZ* による発現制御のメカニズムはシロイヌナズナにおいても未だに未解明であるため、生体内で相互作用するタンパク質と発現制御を受ける遺伝子の解明が求められる。

本研究により、トマト心皮形成および配偶子形成に関する新たな知見を得ることに成功した。さらに、心皮の新しいメカニズムはシロイヌナズナでも報告されておらず、胚珠形成にはシロイヌナズナとの違いを見つけることができた。今後、トマトのみならず多くの植物種で果実発達の研究が進むことを期待したい。

摘要

本研究は果実発達の第一段階である心皮から雌蕊が形成される際の分子制御メカニズム解明を目的とし行われた。

本研究室ではエチルメタンスルホン酸 (EMS) 処理もしくはガンマ線照射にて作出されたトマト ‘Micro-Tom’ の変異体集団を作出している。そして、その中から心皮の合成枚数が増加することで、独立した複数の雌蕊を形成する変異体 *fasciated carpel 1 (fcc1)* 変異体と子房を形成する子房壁が2重, 3重に形成される *fcc2* 変異体, さらに両性不稔性を示す *sexual sterility (ses)* 変異体を単離した。それらの変異体の形態学的解析やマップベースドクローニングおよび全ゲノムシーケンスによる原因遺伝子候補の単離は先行研究により実施された (羽尾 修士論文 2014)。本研究では *fcc2* 変異体と *ses* 変異体に着目し、原因遺伝子の相補性の解析とその遺伝子についての解析を行った。

fcc2 変異体の原因遺伝子候補 *Soly01g010240* を *FCC2/CRCa* とし, *FCC2* の遺伝子発現抑制体 (*FCC2*-RNAi 組換え体) を作出した。その結果, *FCC2/CRCa* とそのパラログ遺伝子の *CRCb* の発現が抑制された *FCC2*-RNAi 組換え体は多重に重なりあった子房壁を形成する雌蕊を持ち, 心皮の合成が WT に比べて増加していることが示された。さらにその心皮の合成は雌蕊の形成が完了した後も継続され, 花芽分裂組織様の組織を持つ果実様組織が形成された。この心皮が過剰に形成される表現型が *fcc2* 変異体と類似していることより, *FCC2* は *fcc2* 変異体の原因遺伝子である可能性が高い。また, 遺伝子発現解析により, *fcc2* 変異体および *FCC2*-RNAi 組換え体で胚珠の形成を制御しているトマト D クラス遺伝子 (*TOMATO AGAMOUS LIKE11 (TAGL11)* と *MADS BOX PROTEIN3 (MBP3)*) の発現が減少していることが分かった。これらの結果より, *FCC2/CRCa* および *CRCb* は花芽分裂組織においてトマト D クラス遺伝子の発現を誘導し, 心皮形成ステージから胚珠形成ステージへ移行させる働きをしていると示唆される。

そして, *ses* 変異体の原因遺伝子候補 *Soly07g063670* を *SES* とし, 初めに *SES* の遺伝子発現抑制体 (*SES*-RNAi 組換え体) を作出した。その結果, *SES* の発現量は低下し, 葯の形態形成に異常がみられたが, 雌雄とも稔性は維持されていた。次に, *SES* の全長 (プロモーター～ターミネーター) を *ses* 変異体に導入し, その表現型を観察した。その結果, *SES* の全長が導入された *ses* 変異体は WT の表現型へと回復した。したがって, 単離された遺伝子 *SES* は *ses* 変異体の原因遺伝子である。さらに, *ses* 変異体の発達ステージ別の

つぼみおよび雌蕊を用いて発現解析を行った。SES は縦径 1 mm 以下のつぼみで強く発現し、雌蕊においては発達ステージが進むほど発現が低下した。さらに、ses 変異体では SES の発現量が WT に比べて減少していた。また、胚珠形成に重要な遺伝子である *WUSCHL (WUS)* と *INNER NO OUTER (INO)* の発現量、および花粉形成に重要な遺伝子である *Tomato Male sterile 10³⁵ (MS10³⁵)* と *EXCESS MICROSPOROCYTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS-like (EMS1/EXS-like)* の発現量が ses 変異体で有意に減少していた。よって SES はこれら配偶子形成に重要な遺伝子の発現を誘導していると示唆される。また、SES タンパクはその C 末端に EAR モチーフをコードしており、SES タンパク自身は転写抑制因子として働くと考えられる。本研究で SES は雌雄の配偶子形成に必要な遺伝子であることが分かった。

以上より、心皮数やその形態は果実形態に大きな影響を与えることが分かった。心皮の形成枚数の増加は果実肥大性の増加を可能にする。また、細かな遺伝子発現の調整は果実形態のデザインを可能にする可能性がある。そして、配偶子形成のカギとなる遺伝子を単離したことで、トマトの配偶子形成の研究がより発展し、トマト果実の品質を左右する種子の有無を自在に決定できるようになると考えられる。

謝辞

本研究の遂行および本博士論文の取りまとめにあたり、懇切丁寧なご指導と的確なご助言を賜りました筑波大学生命環境系教授 江面浩博士に心より感謝の意を表します。同じく本研究の遂行および本博士論文の作成、そして日々の研究の進捗を気にかけてくださりました同大学同系准教授 有泉亨博士に心より感謝申し上げます。また、本博士論文の作成にあたり、ご閲覧の労を賜りました同大学同系教授 大澤良博士、同大学同系教授 三浦謙治博士、同大学同系助教 木下奈都子博士に厚く御礼申し上げます。

そして、本研究の遺伝子組換え体作出におきまして、ご協力いただきました研究補助員の飯田悠子氏および岡野芳子氏に感謝申し上げます。

最後になりますが、本研究の遂行にあたり多大なご助言、ご助力を頂きました蔬菜花卉研究室の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- Alpert KB, Grandillo S, Tanksley SD** (1995) *fw2.2*: a major QTL controlling fruit weight is common to both red- and green-fruited tomato species. *Theor Appl Genet* **91**: 994-1000
- Alvarez-Buylla E, Benítez M, Corvera-Poiré A, Cador AC, de Folter S, de Buen AG, Garay-Arroyo A, García-Ponce B, Jaimes-Miranda F, Pérez-Ruiz RV, Piñeyro-Nelson A, Sánchez-Corrales YE** (2010) Flower development. *The Arabidopsis Book* **8**: e0127
- Alvarez J, Smyth DR** (2002) *CRABS CLAW* and *SPATULA* genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Plant Sci* **163**: 17-41
- Ampomah-Dwamena C, Morris BA, Sutherland P, Veit B, Yao JL** (2002) Down-regulation of *TM29*, a tomato *SEPALLATA* homolog, causes parthenocarpic fruit development and floral reversion. *Plant Physiol* **130**: 605-617
- Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H** (2013) Genes that influence yield in tomato. *Breed Sci* **63**: 3-13
- Arumuganathan K, Earle ED** (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep* **9**: 208-218
- Azzi L, Deluche C, Gévaudant F, Frangne N, Delmas F, Hernould M, Chevalier C** (2015) Fruit growth-related genes in tomato. *J Exp Bot* **66**: 1075-1086
- Baker SC, Robinson-Beers K, Villanueva JM, Gaiser JC, Gasser CS** (1997) Interactions Among Genes Regulating Ovule Development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **145**: 1109-1124
- Balasubramanian S, Schneitz K** (2002) *NOZZLE* links proximal-distal and adaxial-abaxial

pattern formation during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **129**: 4291-4300

Becker A, Ehlers K (2016) Arabidopsis flower development—of protein complexes, targets, and transport. *Protoplasma* **253**: 219-230

Bencivenga S, Colombo L, Masiero S (2011) Cross talk between the sporophyte and the megagametophyte during ovule development. *Sex Plant Reprod* **24**: 113-121

Bencivenga S, Simonini S, Benková E, Colombo L (2012) The transcription factors BEL1 and SPL are required for cytokinin and auxin signaling during ovule development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 2886-2897

Berger Y, Harpaz-Saad S, Brand A, Melnik H, Sirding N, Alvarez JP, Zinder M, Samach A, Eshed Y, Ori N (2009) The NAC-domain transcription factor GOBLET specifies leaflet boundaries in compound tomato leaves. *Development* **136**: 823-832

Bergougnoux V (2014) The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnol Adv* **32**: 170-189

Bowman JL, Drews GN, Meyerowitz EM (1991) Expression of the Arabidopsis floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to Specific cell types late in flower development. *Plant Cell* **3**: 749-758

Bowman JL, Smyth DR (1999) *CRABS CLAW*, a gene that regulates carpel and nectary development in Arabidopsis, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* **126**: 2387-2396

Brambilla V, Battaglia R, Colombo M, Masiero S, Bencivenga S, Kater MM, Colombo L (2007) Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support

ovule development in *Arabidopsis*. Plant Cell **19**: 2544-2556

Canales C, Bhatt AM, Scott R, Dickinson H (2002) *EXS*, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in *Arabidopsis*. Curr Biol **12**: 1718-1727

Carles CC, Lertpiriyapong K, Reville K, Fletcher JC (2004) The *ULTRAPETALAI* gene functions early in Arabidopsis development to restrict shoot apical meristem activity and acts through *WUSCHEL* to regulate floral meristem determinacy. Genet **167**: 1893-1903

Causier B, Schwarz-Sommer Z, Davies B (2010) Floral organ identity: 20 years of ABCs. Semin Cell Dev Biol **21**: 73-79

Causier B, Ashworth M, Guo W, Davies B (2012) The TOPLESS interactome: A framework for gene repression in Arabidopsis. Plant Physiol **158**: 423-438

Ceccato L, Masiero S, Roy DS, Bencivenga S, Roig-Villanova I, Ditengou FA, Palme K, Simon R, Colombo L (2013) Maternal control of PIN1 is required for female gametophyte development in Arabidopsis. PLOS ONE **8**: 2-8

Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, Muños S, Blanca J, Cañizares J, Diez MJ, Schneider R, Mazourek M, McClead J, Causse M, van der Knaap E (2013) A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. Proc Natl Acad Sci **110**: 17125-17130

Chen GH, Sun JY, Liu M, Liu J, Yang WC (2014) SPOROCTELESS is a novel embryophyte-specific transcription repressor that interacts with TPL and TCP proteins in *Arabidopsis*. J Genet Genomics **41**: 617-625

Chomczynski P (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal Biochem **201**: 134-139

Ciftci-Yilmaz S, Morsy MR, Song L, Coutu A, Krizek BA, Lewis MW, Warren D, Cushman J, Connolly EL, Mittler R (2007) The EAR-motif of the Cys2/His2-type zinc finger protein Zat7 plays a key role in the defense response of *Arabidopsis* to salinity stress. J Biol Chem **282**: 9260-9268

Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J **16**: 735-743

Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. Nature **353**: 31-37

Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons HJM, Angenent GC, van Tunen AJ (1995) The petunia MADS box gene *FBP11* determines ovule identity. Plant Cell **7**: 1859-1868

Colombo L, Franken J, Van der Krol AR, Wittich PE, Dons HJM, Angenent GC (1997) Downregulation of ovule-specific MADS box genes from petunia results in maternally controlled defects in seed development. Plant Cell **9**: 703-715

Cong B, Liu J, Tanksley SD (2002) Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. Proc Natl Acad Sci **99**: 13606-13611

Cong B, Barrero LS, Tanksley SD (2008) Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. Nature Genet **40**: 800-804

Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. Nature **418**: 700-707

de Jong M, Mariani C, Vriezen WH (2009a) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit

set. J Exp Bot **60**: 1523-1532

de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH (2009b) The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (*SlARF7*) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. Plant J **57**: 160–170

Durbak AR, Tax FE (2011) CLAVATA signaling pathway receptors of *Arabidopsis* regulate cell proliferation in fruit organ formation as well as in meristems. Genet **189**: 177-194

Elliott RC, Betzner AS, Huttner E, Oakes MP, Tucker WQJ, Gerentes D, Perez P, Smyth DR (1996) *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. Plant Cell **8**: 155-168

Endress PK (2011) Angiosperm ovules: diversity, development, evolution. Ann Bot **107**: 1465-1489

Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Pérez A, Pérez JA (2008) Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. BMC Plant Biol **8**: 131

Fernandez AI, Viron N, Alhagdow M, Karimi M, Jones M, Amsellem Z, Sicard A, Czerednik A, Angenent G, Grierson D, May S, Seymour G, Eshed Y, Lemaire-Chamley M, Rothan C, Hilson P (2009) Flexible tools for gene expression and silencing in tomato. Plant Physiol **151**: 1729-1740

Fernández-Lozano A, Yuste-Lisbona FJ, Pérez-Martín F, Pineda B, Moreno V, Lozano R, Angosto T (2015) Mutation at the tomato *EXCESSIVE NUMBER OF FLORAL ORGANS* (*ENO*) locus impairs floral meristem development, thus promoting an increased number of floral organs and fruit size. Plant Sci **232**: 41-48

Fourquin C, Primo A, Martínez-Fernández I, Huet-Trujillo E, Ferrándiz C (2014) The *CRC* orthologue from *Pisum sativum* shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development. *Ann Bot* **114**: 1535-1544

Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000) *fw2.2*: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88

深澤 郁男, 和田 悦郎, 木村 栄, 安川 俊彦, 栃木 博美, 本島 俊明, 石川 孝一, 赤木 博 (1993) トマトの窓あき果の発生要因について. 栃木農研報 **40**: 13-28

Gimenez E, Castañeda L, Pineda B, Pan IL, Moreno V, Angosto T, Lozano R (2016) *TOMATO AGAMOUS1* and *ARLEQUIN/TOMATO AGAMOUS-LIKE1* MADS-box genes have redundant and divergent functions required for tomato reproductive development. *Plant Mol Biol* **91**: 513-531

Giovannoni JJ, Noensie EN, Ruezinsky DM, Lu X, Tracy SL, Ganai MW, Martin GB, Pillen K, Alpert K, Tanksley SD (1995) Molecular genetic analysis of the *ripening-inhibitor* and *non-ripening* loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol Gen Genet* **248**: 195-206

Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* **16**: S170-S180

Gómez P, Jamilena M, Capel J, Zurita S, Angosto T, Lozano R (1999) *Stamenless*, a tomato mutant with homeotic conversions in petals and stamens. *Planta* **209**: 172-179

Gómez-Mena C, de Folter S, Costa MMR, Angenent GC, Sablowski R (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* **132**: 429-438

Gorguet B, Schipper D, van Lammeren A, Visser RGF, van Heusden AW (2009) *ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene. *Theor Appl Genet* **118**: 1199-1209

Grandillo S, Ku HM, Tanksley SD (1999) Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theor Appl Genet* **99**: 978-987

Groß-Hardt R, Lenhard M, Laux T (2002) *WUSCHEL* signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes Dev* **16**: 1129-1138

Gupta A, Pal RK, Rajam MV (2013) Delayed ripening and improved fruit processing quality in tomato by RNAi-mediated silencing of three homologs of 1-aminopropane-1-carboxylate synthase gene. *J Plant Physiol* **170**: 987-995

Han HQ, Liu Y, Jiang MM, Ge HY, Chen HY (2015) Identification and expression analysis of *YABBY* family genes associated with fruit shape in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Genet Mol Res* **14**: 7079-7091

羽尾 周平 (2014) トマト変異体を用いた雌蕊形成を制御する新規遺伝子の解析. 筑波大大学院 修士学位論文

Hao Y, Wang X, Li X, Bassa C, Mila I, Audran C, Maza E, Li Z, Bouzayen M, van der Rest B, Zouine M (2014) Genome-wide identification, phylogenetic analysis, expression profiling, and protein–protein interaction properties of *TOPLESS* gene family members in tomato. *J Exp Bot* **65**: 1013-1023

Hord CLH, Chen C, DeYoung BJ, Clark SE, Ma H (2006) The BAM1/BAM2 receptor-like kinases are important regulators of *Arabidopsis* early anther development. *Plant Cell* **18**: 1667-1680

Huang Z, Houten JV, Gonzalez G, Xiao H, van der Knaap E (2013) Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OFP* and *YABBY* gene family in tomato. *Mol Genet Genomics* **288**: 111-129

Ito T, Wellmer F, Yu H, Das P, Ito N, Alves-Ferreira M, Riechmann JL, Meyerowitz EM (2004) The homeotic protein AGAMOUS controls microsporogenesis by regulation of *SPOROCTELESS*. *Nature* **430**: 356-360

Jeong HJ, Kang JH, Zhao M, Kwon JK, Choi HS, Bae JH Lee Ha, Joung YH, Choi D, Kang BC (2014) Tomato *Male sterile 10³⁵* is essential for pollen development and meiosis in anthers. *J Exp Bot* **65**: 6693-6709

Kagale S, Rozwadowski K (2011) EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. *Epigenetics* **6**: 141-146

Kamiuchi Y, Yamamoto K, Furutani M, Tasaka M, Aida M (2014) The *CUC1* and *CUC2* genes promote carpel margin meristem formation during *Arabidopsis* gynoecium development. *Front Plant Sci* **5**: 1-9

Kelley DR, Gasser CS (2009) Ovule development: genetic trends and evolutionary considerations. *Sex Plant Reprod* **22**: 229-234

Kelley DR, Skinner DJ, Gasser CS (2009) Roles of polarity determinants in ovule development. *Plant J* **57**: 1054-1064

Kramer M, Sanders R, Bolkan H, Waters C, Sheehy RE, Hiatt WR (1992) Postharvest evaluation of transgenic tomatoes with reduced levels of polygalacturonase: processing, firmness and disease resistance. *Postharvest Biol Technol* **1**: 241-255

Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV (2003) Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res* **31**: 532-550

Landau U, Asis L, Williams LE (2015) The *ERECTA*, *CLAVATA* and class *III HD-ZIP* pathways display synergistic interactions in regulating floral meristem activities. *PLoS ONE* **10**: 5

Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87-96

Lee JY, Baum SE, Alvarez J, Patel A, Chitwood DH, Bowman JL (2005a) Activation of *CRABS CLAW* in the nectaries and carpels of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 25-36

Lee JY, Baum SE, Oh SH, Jiang CZ, Chen JC, Bowman JL (2005b) Recruitment of *CRABS CLAW* to promote nectary development within the eudicot clade. *Development* **132**: 5021-5032

Lee MS, Gippert GP, Soman KV, Case SD, Wright PE (1989) Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain. *Science* **245**: 635-637

Lejeune F, Maquat LE (2005) Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 309-315

Lenhard M, Bohnert A, Jürgens G, Laux T (2001) Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* **105**: 805-814

Leseberg CH, Eissler CL, Wang X, Johns MA, Duvall MR, Mao L (2008) Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *J Exp Bot* **59**: 2253-2265

Lincoln JE, Fischer RL (1988) Regulation of gene expression by ethylene in wild-type and

rin tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. Plant Physiol **88**: 370-374

Lippman Z, Tanksley SD (2001) Dissecting the genetic pathway to extreme fruit size in tomato using a cross between the small-fruited wild species *Lycopersicon pimpinellifolium* and *L. esculentum* var. Giant Heirloom. Genetics **158**: 413-422

Liu J, van Eck J, Cong B, Tanksley SD (2002) A new class of regulatory genes underlying the cause of pear-shaped tomato fruit. Proc Natl Acad Sci **99**: 13302-13306

Liu J, Cong B, Tanksley SD (2003) Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus *fw2.2* controls fruit size. Plant Physiol **132**: 292-299

Liu M, Pirrello J, Chervin C, Roustan JP, Bouzaten M (2015) Ethylene control of fruit ripening: Revisiting the complex network of transcriptional regulation. Plant Physiol **169**: 2380-2390

Liu X, Huang J, Parameswaran S, Ito T, Seubert B, Auer M, Rymaszewski A, Jia G, Owen HA, Zhao D (2009) The *SPOROCTELESS/NOZZLE* gene is involved in controlling stamen identity in Arabidopsis. Plant Physiol **151**: 1401-1411

Lora J, Hormaza JI, Herrero M (2015) Transition from two to one integument in *Prunus* species: expression pattern of *INNER NO OUTER (INO)*, *ABERRANT TESTA SHAPE (ATS)* and *ETTIN (ETT)*. New Phytol **208**: 584-595

Lozano R, Giménez E, Cara B, Capel J, Angosto T (2009) Genetic analysis of reproductive development in tomato. Int J Dev Biol **53**: 1635-1648

Martí C, Orzaez D, Ellul P, Moreno V, Carbonell J, Granell A (2007) Silencing of *DELLA* induces facultative parthenocarpy in tomato fruits. Plant J **52**: 865-876

Mathieu-Rivet E, Gévaudant F, Sicard A, Salar S, Do PT, Mouras A, Fernie AR, Gibon Y, Rothan C, Chevalier C, Hernould M (2010) Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *Plant J* **62**: 727-741

Misra A, Sriram G (2013) Network component analysis provides quantitative insights on an Arabidopsis transcription factor-gene regulatory network. *BMC Syst Biol* **7**: 126

Mittler R, Kim Y, Song L, Coutu J, Coutu A, Ciftci-Yilmaz S, Lee H, Stevenson B, Zhu JK (2006) Gain- and loss-of-function mutations in *Zat10* enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Lett* **580**: 6537-6542

Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gómez P, Capel J, Lozano R (1999) *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J* **20**: 685-693

Mounet F, Moing A, Kowalczyk M, Rohrmann J, Petit J, Garcia V, Maucourt M, Yano K, Deborde C, Aoki K, Bergès H, Granell A, Fernie AR, Bellini C, Rothan C, Lemaire-Chamley M (2012) Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development. *J Exp Bot* **63**: 4901-4917

Mubarok S, Okabe Y, Fukuda N, Ariizumi T, Ezura H (2015) Potential use of a weak ethylene receptor mutant, *Sletr1-2*, as breeding material to extend fruit shelf life of tomato. *J Agric Food Chem* **63**: 7995-8007

Mubarok S, Okabe Y, Fukuda N, Ariizumi T, Ezura H (2016) Favorable effects of the weak ethylene receptor mutation *Sletr1-2* on postharvest fruit quality changes in tomatoes. *Postharvest Biol Technol* **120**: 1-9

Muños S, Ranc N, Botton E, Bérard A, Rolland S, Duffé P, Carretero Y, Paslier CM, Delalande C, Bouzayen M, Brunel D, Causse M (2011) Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near *WUSCHEL*. *Plant Physiol* **156**: 2244-2254

Nakano T, Kimbara J, Fujisawa M, Kitagawa M, Ihashi N, Maeda H, Kasumi T, Ito Y (2012) MACROCALYX and JOINTLESS interact in the transcriptional regulation of tomato fruit abscission zone development. *Plant Physiol* **158**: 439-450

Ocares N, Mejía N (2016) Suppression of the D-class MADS-box *AGL11* gene triggers seedlessness in fleshy fruits. *Plant Cell Rep* **35**: 239-254

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

Okabe Y, Ariizumi T, Ezura H (2013) Updating the Micro-Tom TILLING platform. *Breed Sci* **63**: 42-48

Orashakova S, Lange M, Lange S, Wege S, Becker A (2009) The *CRABS CLAW* ortholog from California poppy (*Eschscholzia californica*, *Papaveraceae*), *EcCRC*, is involved in floral meristem termination, gynoecium differentiation and ovule initiation. *Plant J* **58**: 682-693

太田 勝巳, 豊田 賢司, 細木 高志 (2002) トマト乱形果の花芽分化の品種比較. *Hort Res* **1**: 107-110

Pan IC, Li CW, Su RC, Cheng CP, Lin CS, Chan MT (2010) Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SlERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Planta* **232**: 1075-1086

Paran I, van der Knaap E (2007) Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *J Exp Bot* **58**: 3841-3852

Parapunova V, Busscher M, Busscher-Lange J, Lammers M, Karlova R, Bovy AG, Angenent GC, de Maagd RA (2014) Identification, cloning and characterization of the tomato TCP transcription factor family. *BMC Plant Biol* **14**: 157

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45

Pinyopich A, Ditta GS, Savidge B, Liljegren SJ, Baumann E, Wisman E, Yanofsky MF (2003) Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**: 85-88

Plackett ARG, Thomas SG, Wilson ZA, Hedden P (2011) Gibberellin control of stamen development: a fertile field. *Trends Plant Sci* **16**: 568-578

Pnueli L, Hareven D, Rounsley SD, Yanofsky MF, Lifschitz E (1994) Isolation of the tomato *AGAMOUS* gene *TAG1* and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* **6**: 163-173

Qian X, Weiss MA (1992) Two-dimensional NMR studies of the zinc finger motif solution structures and dynamics of mutant ZFY domains containing aromatic substitutions in the hydrophobic core. *Biochem* **31**: 7463-7476

Quinet M, Bataille G, Dobrev PI, 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. *J Exp Bot* **65**: 2243-2256

Robinson-Beers K, Pruitt RE, Gasser CS (1992) Ovule development in wild-type *Arabidopsis* and two female-sterile mutants. *Plant Cell* **4**: 1237-1249

Robles P, Pelaz S (2005) Flower and fruit development in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Dev Biol* **49**: 633-643

Running MP, Lavy M, Sternberg H, Galichet A, Gruissem W, Hake S, Ori N, Yalovsky S (2004) Enlarged meristems and delayed growth in *plp* mutants result from lack of CaaX prenyltransferases. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 7815-7820

Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, 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 Physiol* **52**: 283-296

Schiefthaler U, Balasubramanian S, Sieber, P, Chevalier D, Wisman E, Schneitz K (1999) Molecular analysis of *NOZZLE*, a gene involved in pattern formation and early sporogenesis during sex organ development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11664-11669

Schneitz K, Hülskamp M, Kopczak SD, Pruitt RE (1997) Dissection of sexual organ ontogenesis: a genetic analysis of ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 1367-1376

Schuch W, Kanczler J, Robertson D, Hobson G, Tucker G, Grierson D, Bright S, Bird C (1991) Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortScience* **26**: 1517-1520

Scott JW, Harbaugh BK (1989) Micro-Tom - a miniature dwarf tomato. *Florida Agricultural Experiment Station Circulation* **370**: 1-6

Serrat X, Esteban R, Guibourt N, Moysset L, Nogués S, Lalanne E (2014) EMS mutagenesis in mature seed-derived rice *calli* as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Methods* **10**: 5

Shikata M, Hoshikawa K, Ariizumi T, Fukuda N, Yamazaki Y, Ezura H (2016) TOMATOMA update: Phenotypic and metabolite information in the Micro-Tom mutant resource. *Plant Cell Physiol* **57**: e11

Sicard A, Petit J, Mouras A, Chevalier C, Hernould M (2008) Meristem activity during flower and ovule development in tomato is controlled by the mini zinc finger gene *INHIBITOR OF MERISTEM ACTIVITY*. *Plant J* **55**: 415-427

Sieber P, Gheyselinck J, Gress-Hardt R, Laux T, Grossniklaus U, Schneitz K (2004a) Pattern formation during early ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol* **273**: 321-334

Sieber P, Petrascheck M, Barberis A, Schneitz K (2004b) Organ polarity in Arabidopsis. NOZZLE physically interacts with members of the YABBY family. *Plant Physiol* **135**: 2172-2185

Skinner DJ, Brown RH, Kuzoff RK, Gasser CS (2016) Conservation of the role of *INNER NO OUTER* in development of unitegmatic ovules of the Solanaceae despite a divergence in protein function. *BMC Plant Biol* **16**: 143

Sovolev AP, Neelam A, Fatima T, Shukla V, Handa AK, Mattoo AK (2014) Genetic introgression of ethylene-suppressed transgenic tomatoes with higher-polyamines trait overcomes many unintended effects due to reduced ethylene on the primary metabolome. *Front Plant Sci* **5**: 632

Sun HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation protocol for

Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426–431

Sun W, Huang W, Li Z, Lv H, Huang H, Wang Y (2013) Characterization of a Crabs Claw Gene in Basal Eudicot Species *Epimedium sagittatum* (Berberidaceae). *Int J Mol Sci* **14**: 1119-1131

Szymkowiak EJ, Sussex IM (1992) The internal meristem layer (L3) determines floral meristem size and carpel number in tomato periclinal chimeras. *Plant Cell* **4**: 1089-1100

Tanksley SD (2004) The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell* **16**: S181-S189

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

Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo CA, Enns L, Odden AR, Greene EA, Comai L, Henikoff S (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol* **4**: 12

Tsutsui T, Kato W, Asada Y, Sako K, Sato T, Sonoda Y, Kidokoro S, Yamaguchi-Shinozaki K, Tamaoki M, Arakawa K, Ichikawa T, Nakazawa M, Seki M, Shinozaki K, Matsui M, Ikeda, Yamaguchi J (2009) DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in Arabidopsis. *J Plant Res* **122**: 633-643

Tzeng TY, Chen HY, Yang CH (2002) Ectopic expression of carpel-specific MADS box genes from lily and lisianthus causes similar homeotic conversion of sepal and petal in Arabidopsis. *Plant Physiol* **130**: 1827-1836

Upadhyay RK, Soni DK, Singh R, Dwivedi UN, Pathre UV, Nath P, Sane AP (2013) *SlERF36*, an EAR-motif-containing ERF gene from tomato, alters stomatal density and

modulates photosynthesis and growth. *J Exp Bot* **64**: 3237-3247

Upadhyay RK, Gupta A, Ranjan S, Singh R, Pathre UV, Nath P, Sane AP (2014) The EAR motif controls the early flowering and senescence phenotype mediated by over-expression of SIERF36 and is partly responsible for changes in stomatal density and photosynthesis. *PLoS ONE* **9**: 1-9

Van de Poel B, Bulens I, Markoula A, Hertog MLATM, Dreesen R, Wirtz M, Vandoninck S, Oppermann Y, Keulemans J, Hell R, Waelkens E, De Proft MP, Sauter M, Nicolai BM, Geeraerd AH (2012) Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the Yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. *Plant Physiol* **160**: 1498-1514

van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu YH, Clevenger JP, Illa-Berenguer E, Huang Z, Keyhaninejad N, Mu Q, Sun L, Wang Y (2014) What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front Plant Sci* **5**: 227

Villanueva JM, Broadhvest J, Hauser BA, Meister RJ, Schneitz K, Gasser CS (1999) *INNER NO OUTER* regulates abaxial-adaxial patterning in *Arabidopsis* ovules. *Genes Dev* **13**: 3160-3169

Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2005) The tomato *Aux/IAA* transcription factor *IAA9* is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* **17**: 2676-2692

Wang H, Schauer N, Usadel B, Frasse P, Zouine M, Hernould M, Latche A, Pech JC, Fernie AF, Bouzayen M (2009) Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell* **21**: 1428-1452

Wang ZI, Ren Y (2008) Ovule morphogenesis in ranunculaceae and its systematic significance. *Ann Bot* **101**: 447-462

Wei B, Zhang J, Pang C, Yu H, Guo D, Jiang H, Ding M, Chen Z, Tao Q, Gu H, Qu LJ, Qin G (2015) The molecular mechanism of SPOROCTELESS/NOZZLE in controlling *Arabidopsis* ovule development. *Cell Res* **25**: 121-134

Wilkinson JQ, Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ (1995) An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science* **270**: 1807-1809

Wu S, Xiao H, Cabrera A, Meulia T, van der Knaap E (2011) *SUN* regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns. *Plant Physiol* **157**: 1175-1186

Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YH, Jiang K, Brooks C, Ogawa-Ohnishi M, Xiong G, Pauly M, Van Eck J, Matsubayashi Y, van der Knaap E, Lippman ZB (2015) A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nature Genet* **47**: 784-792

Yamada T, Sasaki Y, Hashimoto K, Nakajima K, Gasser CS (2016) *CORONA*, *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* collaborate with *BELL1* to confine *WUSCHEL* expression to the nucellus in *Arabidopsis* ovules. *Development* **143**: 422-426

Yamaguchi T, Nagasawa N, Kawasaki S, Matsuoka M, Nagato Y, Hirano HY (2004) The *YABBY* gene *DROOPING LEAF* regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell* **16**: 500-509

Yang SL, Xie LF, Mao HZ, Puah CS, Yang WC, Jiang L, Sundaresan V, Ye D (2003) *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the *Arabidopsis* anther. *Plant Cell* **15**: 2792-2804

Yang WC, Ye D, Xu J, Sundaresan V (1999) The *SPOROCTELESS* gene of *Arabidopsis* is required for initiation of sporogenesis and encodes a novel nuclear protein. *Genes Dev* **13**: 2108-2117

Yuste-Lisbona FJ, Quinet M, Fernández-Lozano A, Pineda B, Moreno V, Angosto T, Lozano R (2016) Characterization of *vegetative inflorescence (mc-vin)* mutant provides new insight into the role of *MACROCALYX* in regulating inflorescence development of tomato. *Sci Rep* **6**: 18796

Zhang W, Sun Y, Timofejeva L, Chen C, Grossniklaus U, Ma H (2006) Regulation of *Arabidopsis* tapetum development and function by *DYSFUNCTIONAL TAPETUM1 (DYT1)* encoding a putative bHLH transcription factor. *Development* **133**: 3085-3095

Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002) The *EXCESS MICROSPOROCTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* **16**: 2021-2031