

ジベレリン情報伝達制御遺伝子 *SIDELLA*
によるトマト果実発達の作用機構解明

2018年 1月

江面 健太郎

ジベレリン情報伝達制御遺伝子 *SIDELLA*
によるトマト果実発達の作用機構解明

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

江面 健太郎

目次

目次	・ ・ ・ ・ ・ i
図表目次	・ ・ ・ ・ ・ iv
略語	・ ・ ・ ・ ・ vii
序論	・ ・ ・ ・ ・ 1
1. トマト研究とゲノム情報の利用	・ ・ ・ ・ ・ 2
1-1 研究材料としてのトマト	
1-2 トマトを用いた研究基盤の整備	
2. 果実発達とジベレリン (Gibberellic acid, GA)	・ ・ ・ ・ ・ 4
2-1 植物発達と GA	
2-2 着果と GA	
2-3 単為結果性と GA	
2-4 GA と着果以降の果実発達	
3. GA 生合成及びシグナル伝達の分子機構	・ ・ ・ ・ ・ 7
3-1 GA の生合成	
3-2 DELLA タンパク質の機能調節機構	
3-3 DELLA タンパク質と転写因子タンパク質の植物発達における役割	
3-3-1 隔離剤様機能 (タイプ 1) の標的因子	
3-3-2 コアクチベーター機能 (タイプ 2) の標的因子	
3-4 DELLA タンパク質と非転写因子タンパク質の植物発達における役割	
3-5 トマトの SIDELLA 変異体 <i>procera</i> について	
4. 本課題の目的と概要	・ ・ ・ ・ ・ 20
4-1 目的と意義	
4-2 研究の概要	
5. 図表	・ ・ ・ ・ ・ 22
第 1 章 果実発達期における GA シグナル下流遺伝子の探索	・ ・ ・ ・ ・ 32
1-1 緒言	・ ・ ・ ・ ・ 33

1-2 材料及び方法	・ ・ ・ ・ ・ 34
1-2-1 雌蕊特異的遺伝子の選抜と発現組織の特定	
1-2-2 雌蕊特異的遺伝子の組織特異的発現の確認	
1-2-3 GA 応答性雌蕊特異的発現遺伝子の抽出	
1-2-4 機能未知遺伝子の配列解析及びプロモーター領域のシスエレメントの解析	
1-3 結果及び小考察	・ ・ ・ ・ ・ 36
1-3-1 RNA-seq データを用いた雌蕊特異的発現遺伝子の選抜	
1-3-2 RNA-seq データを用いた GA 応答性雌蕊特異的発現遺伝子の選抜	
1-3-3 GA 応答性 PSGs の転写調節領域配列 (プロモーター配列) の解析	
1-3-4 第 1 章のまとめ	
1-4 図表	・ ・ ・ ・ ・ 43
第 2 章 SIDELLA 相互作用因子候補 (CDIs) のスクリーニング	・ ・ ・ ・ ・ 59
2-1 緒言	・ ・ ・ ・ ・ 60
2-2 材料及び方法	・ ・ ・ ・ ・ 61
2-2-1 トマト GID1 タンパク質の単離と配列解析	
2-2-2 SIDELLA タンパク質のクローニングとオートアクチベーションの評価	
2-2-2-1 クローニング及び Y2H ベクターの構築	
2-2-2-2 酵母の形質転換及びオートアクチベーション作用の評価	
2-2-3 SIDELLA と GID1 の相互作用の評価	
2-2-3-1 Yeast two hybrid 法による相互作用の検証	
2-2-4 cDNA ライブラリーを用いた CDIs のスクリーニング	
2-2-5 RNA-sequence データを用いた CDIs の発現組織の調査	
2-2-6 SIDELLA 全長と CDIs の相互作用の確認	
2-2-6-1 クローニング及び Y2H ベクターの構築	
2-2-6-2 酵母の形質転換及び相互作用の評価	
2-2-6-3 タンパク質の発現の確認	
2-2-8 CDI5 の SIDELLA 相互作用部位の同定	
2-2-9 CDI5 ホモログの選抜及び発現組織の調査	
2-3 結果及び小考察	・ ・ ・ ・ ・ 70

2-3-1	SIDELLA と GID1 の相互作用の評価	
2-3-2	cDNA ライブラリーを用いた CDIs のスクリーニング	
2-3-3	CDIs と SIDELLA の相互作用	
2-3-3-1	スクリーニング 1 の選抜候補と SIDELLA の相互作用の検証	
2-3-3-2	スクリーニング 2 の選抜候補と SIDELLA の相互作用の検証	
2-3-4	CDI5 ホモログの選抜及び発現組織の調査	
2-3-5	第 2 章のまとめ	
2-4	図表	・ ・ ・ ・ ・ 77
第 4 章	総合考察	・ ・ ・ ・ ・ 94
4-1	総合考察	・ ・ ・ ・ ・ 95
	摘要	・ ・ ・ ・ ・ 98
	謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 99
	参考文献	・ ・ ・ ・ ・ 100

図表目次

図 1.	ジベレリン (GA) の植物発達における役割
図 2.	ジベレリン (GA) の果実発達における役割
図 3.	ジベレリン (GA) の代謝経路
図 4.	DELLA タンパク質の機能ドメイン
図 5.	DELLA タンパク質の機能
図 6.	翻訳後修飾による DELLA の安定性の調節
図 7.	O-GlcNAcylation 及び O-fucosylation による DELLA の親和性の調節
図 8.	DELLA と DIP の相互作用を介した様々なシグナルのクロストーク
図 9.	トマト <i>sidella</i> 変異体の特性
図 10.	SIDELLA を介した GA シグナルの果実発達における役割の理解に向けて
表 1-1.	トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) のリスト

- 表 1-2. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) のホモログ遺伝子のリスト
- 表 1-3. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の子房での細胞種別発現パターン
- 表 1-4. *PSGs* に含まれた小タンパク質 (200a アミノ酸以下+*TPDI*) のリスト
- 表 1-5. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の着果及び GA シグナルへの応答性
- 表 1-6. 第 1 章で使用したプライマーリストと RT-PCR の反応条件
- 図 1-1. トマトの様々な組織の網羅的遺伝子発現解析 (江面, 修士論文, 2015)
- 図 1-2. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子の選抜
- 図 1-3. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の細胞種別の発現パターン
- 図 1-4. 雌蕊特異的な Cystein rich peptides (CPRs) と LRR-RLK 様遺伝子のリスト
- 図 1-5. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の開花日及び開花後 4 日目での発現
- 図 1-6. 雌蕊特異的 GA 応答遺伝子 (Pistil-specific GA-responsive genes; PS-GRGs)
- 図 1-7. インベルターゼインヒビター様遺伝子は着果に関連した発現パターンを示す
- 図 1-8. *EGG CELL 1 (EC1)* 様遺伝子の雌蕊特異的発現遺伝子の選抜
- 図 1-9. GA 応答性雌蕊特異的遺伝子のプロモーター領域の解析
- 図 1-10. 第 1 章の解析のまとめ
-
- 図 2-1. *GIDI* ファミリー遺伝子の系統樹
- 図 2-2. *GIDI* ファミリーのアラインメント
- 図 2-3. *GIDI* ファミリー遺伝子のトマトでの発現
- 図 2-4. タンパク質間相互作用の検出に用いた Yeast two hybrid (Y2H) 法
- 図 2-5. *SIDELLA* のオートアクチベーション活性
- 図 2-6. *sidella* 変異体
- 図 2-7. *SIDELLA* と *SIGID1s* の相互作用また *pro* 変異及び *pro2* 変異の影響
- 図 2-8. *SIDELLA* と *SIGID1s* の相互作用
- 図 2-9. *SIDELLA* 相互作用因子のスクリーニング
- 図 2-10. *SAMSs* と *SIDELLA* の相互作用の検証 1
- 図 2-11. *SAMSs* と *SIDELLA* の相互作用の検証 2
- 図 2-12. *S-adenosylmethionine synthesis (SAMS)* による遺伝子の発現抑制抑制モデル
- 図 2-13. *SICNR13* と *SIDELLA* の相互作用の検証
- 図 2-14. *CDI3* と *SIDELLA* の相互作用の検証

図 2-15. CDI7 と SIDELLA の相互作用の検証

図 2-16. CDI5 と SIDELLA の相互作用の検証

図 2-17. 第 2 章の解析のまとめ

略語表

GA	Gibberellic acid
Aux	Auxin
PSG	Pistil-specific gene
PS-GRG	Pistil-specific GA-regulated gene
OPE	Ovule preferentially expressed
EPE	Embryo preferentially expressed
DIP	DELLA-interacting protein
DBF	Day before flowering
DAF	Day after flowering
CDI	Candidate of DELLA Interactor
DIP	DELLA-INTRACTING PROTEIN
CS	Co-suppression
Y2H	Yeast two hybrid
PCR	polymerase chain reaction
ABA	Abscisic acid

序論

序論

1. トマト研究とゲノム情報の利用

1-1 研究材料としてのトマト

トマト (*Solanum lycopersicum* L.) は、南アメリカ大陸のペルー周辺のアンデス地域に生息する野生種 *Solanum pimpinellifolium* がメキシコもしくはペルー北部地域で栽培化され誕生した *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* を起源にしているとされる (Ranc *et al.*, 2008). そして 16 世紀ごろに、スペインから来たコンキスタドールらによってヨーロッパに持ち帰られ、19 世紀ごろに北アメリカで作物として改良されて世界に広まっていったと考えられている (Jenkins, 1948). 世界的に見ても極めて需要の大きな食料資源である果樹や果菜類の中でも、特にナス科に属するトマトは世界各地で消費されている代表的な果菜類である. 2014 年時点では、世界全体でのトマトの生産量が約 1 億 7 千万トンであり野菜類の中では最も経済的に重要な作物である (FAOSTAT, 2017). そのような理由もあり、トマトは果菜類や果樹における果実発達や果実内の代謝のモデルとして様々な研究機関が結集し世界的なプロジェクトもつくられ精力的に研究が進められてきた. 2012 年には次世代シーケンシング技術を用いた栽培種トマト“Heinz 1706”の全ゲノム情報が発表された (Tomato Genome Consortium, 2012). その後、シーケンシング技術の向上により、野生種・近縁種・栽培種を含めた 360 ものアクセッションの全ゲノム解読が実施され、トマトの栽培化や栽培形質の改良などの歴史をゲノムや遺伝子の観点からより明らかになってきた (Blanca *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014). 例えば、栽培化の過程で収量性の向上やカロテノイド・リコピンなどの機能性成分の向上に寄与した遺伝子が複数同定された. また、トマトの属するナス科はゲノム研究が先行しているアブラナ科やマメ科とは進化的に遠い関係にあり、植物の進化を考える上で重要な情報を提供している. ナス科植物では、トマトに加えてジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.), トウガラシ (*Capsicum annuum* L.), ナス (*Solanum melongena* L.) の全ゲノムが解読されている (The Potato Genome Sequencing Consortium, 2011; Kim *et al.*, 2014; Hirakawa *et al.*, 2014). これらの情報は、ナス科やトマト特有の遺伝子の発見から、それぞれの植物の特性の解明への貢献が期待される (Tomato Genome Consortium, 2012).

トマトは果菜類のモデルとして、特に果実形態や肥大性、あるいは成熟などの果実発達や一次・二次代謝反応のメカニズム解明に着目した研究が進められている (van der Knaap *et al.*, 2014; Pesaresi *et al.*, 2014). トマトの全ゲノムが解読されたことにより、果

実の品質や収量に大きく関与する様々な複数の量的形質座位 (Quantitative trait locus; QTL) の原因遺伝子も同定されつつある。例をあげると、現在の商業トマトの特徴的な形質の一つである果実の均一な着色に関与する遺伝子として *Uniform ripening (U)* が同定された。U 遺伝子は *Solanum lycopersicum GOLDEN 2-LIKE (SlGLK2)* という転写因子をコードしており、多くの栽培種トマトでは同遺伝子が機能欠損することで果実の上部へのクロロフィルの蓄積が抑制されている。それにより着色が果実全体で均一に進むようになり、栽培中に収穫時期が特定しやすくなったとされている (Powell *et al.*, 2012)。2013 年、2015 年には栽培化に伴った果実重量の増大に大きく寄与する *fruit weight 3.1 (fw3.1)* や *fasciated (fas)* 並びに *locular number (lc)* の原因遺伝子が同定された (Chakrabarti *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; Mu *et al.*, 2017; Rodríguez-Leal *et al.*, 2017)。また、果実内のリンゴ酸含量の増加に関わる QTL の原因遺伝子も同定されている (Ye *et al.*, 2017)。

1-2 トマトを用いた研究基盤の整備

トマトを含めた様々な植物のゲノム情報解読に並行して、“如何にゲノム情報を利用するか”という観点から、変異体集団の作出、野生種などの遺伝資源の充実化、並びに遺伝子発現データを活用したデータベースの構築が進められている。日本では、ライフサイエンス研究の基盤となるバイオリソース (動物、植物等) について収集・保存・提供を行うナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP: <http://www.nbrp.jp/>) が行われており、筑波大学では、ナス科植物および果実発達のモデル植物として小型矮性品種トマト ‘Micro-Tom’ のバイオリソース整備が行われている [NBRP トマト (トマトナショナルバイオリソースプロジェクト; <http://tomato.nbrp.jp/>)]. 心止まり性の矮性品種である ‘Micro-Tom’ は、植物体サイズが 10–20 cm と小型で、かつ蛍光灯下でも発育するため研究室などの省スペースでの栽培に適している。さらに、生活環が約 70–90 日と短く、大型品種と比べ効率的な遺伝学的研究が可能である (Scott and Harbaugh, 1989; Martí *et al.*, 2006)。また現在では ‘Micro-Tom’ の全ゲノム配列情報も解読され、Heinz1706 との間に存在する SNP 情報も明らかになっている (Kobayashi *et al.*, 2014)。NBRP では、‘Micro-Tom’ の大規模な EMS (Ethylmethane sulfonate) 変異体集団が作出されている (Saito *et al.*, 2011; Shikata *et al.*, 2016)。次世代シーケンサーによるゲノム配列解析を組み合わせた新たな原因遺伝子同定手法 (例. MutMap 法) を用いることで、順遺伝学的

研究もより効率的に行える (Abe *et al.*, 2012; Ariizumi *et al.*, 2014). また, 変異体集団とゲノム情報から TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) による目的遺伝子の変異体獲得が可能である (Okabe *et al.*, 2011; Okabe *et al.*, 2012; Okabe *et al.*, 2013).

さらに, 器官・組織ごとの発現解析に加えて細胞種別の網羅的発現解析が可能である (Pattison *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2016). これに伴い, より詳細で膨大な情報が蓄積されている. そのため, 現代ではそれらの膨大なデータを活用した研究アプローチの役割も大きくなっている. 近年では, 膨大なデータの統合的な利用を目指す公共データベースが作られてきている. 特に, トマトに関連する代表的なものとして Tomato eFP browser (http://bar.utoronto.ca/efp_tomato/cgi-bin/efpWeb.cgi) , TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/login>), Tomato Expression Atlas (<http://tea.solgenomics.net/>) などがあげられる. また, BioGRID (<https://thebiogrid.org/>) や STRING (<https://thebiogrid.org/>) といったタンパク質の相互作用情報などがまとめられたデータベースも存在する. これらのデータベースを利用することで, 研究対象とする遺伝子について組織別の発現情報や異なる植物種のホモログ遺伝子の発現情報, 共発現遺伝子の情報を得ることが可能となっている.

以上, トマトでも EMS 変異体や効率的な組換え技術および TILLING プラットフォームの確立並びに遺伝子発現データベースの充実によりゲノム情報を利用した詳細な研究を効率的に進める環境が整っている. 今後は, トマトでも現在までに確立されてきた研究基盤とそれらを利用した逆遺伝学的なアプローチなども組み合わせ, 特徴である果実発達に関わるメカニズムや栽培形質へ関与する重要な遺伝子が迅速に同定されることが期待される.

2. 果実発達と GA

2-1 植物発達と GA

ジベレリン (Gibberellic acid, GA) は *ent*-ジベレランを母格として持つジテルペン化合物の総称で, 約半世紀前に初めて GA の構造が推定されてから 2016 年時点までで 136 種類の GA が同定されている (Hedden, 2016). GA は植物の様々な発達過程を制御している (図 1). 例えば, 種子の発芽, 根の伸長, 茎の伸長, 葉の肥大, 着果, 花成などの促進的な役割をする一方で, 側根形成, 老化の進行, 側芽の形成, 分裂組織のサイズ, クロロフィル・カロテノイド・アントシアニンなどの色素蓄積に対しては抑制的な役割を

することが知られている (Achard and Genschik, 2009).

2-2 着果と GA

GA は植物ホルモンであるオーキシシン (Auxin, Aux) と共に着果を誘導する主要な因子である (de Jong *et al.*, 2009) (図 2A). 雌蕊は受粉・受精後に、子房が急速に肥大することで花器官から果実としての発達に転移する. 一般的に、受精後に子房内で Aux 合成が引き起こされ、Aux シグナルが活性化する (Gillaspy *et al.*, 1993). Aux シグナルは子房の細胞分裂を促進するのと同時に、GA 合成を誘導する. GA 合成が促進されることにより子房内の GA 含量が高まって下流の GA シグナルを活性化する. それに伴い、子房では細胞分裂が優先的なステージから細胞肥大が優先的なステージへ転移する. 本論文では、この一連の反応により休止状態の子房が肥大していく現象を着果と定義する. 着果誘導では Aux が休止状態の子房の発達を促す最初のシグナルであると考えられている. 一方で、GA シグナルを抑制することで Aux によって誘導される着果が抑制される (Serrani *et al.*, 2007). これは、Aux シグナルの下流で GA シグナルが機能することを示唆している. GA 合成及び GA シグナル伝達機構については後述する.

2-3 単為結果性と GA

単為結果性とは受粉・受精に依存せず着果が誘導される性質である. 一般的に、栽培種トマトは同じ花の花粉と雌ずい間で受粉・受精が起こる自殖生植物であるため、正常な花粉と雌しべが形成される条件下では風や昆虫による振動で自家受粉が行われる. 一方、日本のトマト栽培で一般的なハウスなどを用いた施設栽培では、風や昆虫を媒介とした受粉が起きにくく受粉や確率が低下して着果が悪くなる. さらに、受粉や受精は光・気温・相対湿度などの環境条件によりその効率が大きく左右されてしまう (Pressman *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2016). そこでトマトの栽培では、着果促進と肥大促進を目的に、合成 Aux や合成 GA などの植物ホルモン処理が行われている (Mapelli *et al.*, 1978; Ho and Hewitt, 1986; Kataoka *et al.*, 2009) (図 2B). また、ブドウでも‘タネなし’果実を作ることを目的に、GA もしくは GA とサイトカイニン (CK) を混合した液の処理による単為結果の誘導が一般的に行われている (角ら, 1973). 一方、これらの着果作業には多くのコスト・労力がかかる上に奇形果や空洞果など果実品質への悪影響も生じる (Abad and Monterio, 1989; 藤村ら, 1962; 片岡ら, 1994) ことから、その問題を軽減す

るために単為結果性品種の獲得が試みられてきた。これまで単為結果性をもたらす自然変異がいくつか発見されている。例えば、*pat-2* 変異及び *pat-3/pat-4* は、それぞれ数種類の栽培種トマト (*S. lycopersicum*) と野生種 *S. habrochaites* の交配により作出されたトマト品種 ‘Severianin’ と 2 種類の弱い単為結果性品種の交配によって作出された ‘PR75/59’ の単為結果性に関与する。‘Severianin’ は高い単為結果性を示し果実サイズも通常の果実と同程度まで肥大する一方で、*pat-2* の表現型は導入する品種の遺伝的背景に依存する問題がある (Gorguet *et al.*, 2008)。また、‘PR75/59’ は果実サイズの不安定性が報告されている (Philouze and Maisonneuve, 1978)。これらの単為結果性にも GA が関与していることが示唆されているものの、原因遺伝子や単為結果誘導の詳細なメカニズムについては未だ理解が進んでいない (Fos *et al.*, 2000, 2001; Olimpieri *et al.*, 2007; Serrani *et al.*, 2007; Ruiu *et al.*, 2015)。もう一つ、単為結果性と共存する重要な課題として採種性の問題が挙げられる。*pat-2* 変異を持つ ‘Severianin’ では、子房での GA 高蓄積に起因する単為結果性と共に採種性の低下がみられる。単為結果果実の胚のう内における胚形成は果実肥大と相関すると同時に、受精の阻害に働いている可能性がある (Kataoka *et al.*, 2003, 2008)。この胚形成は、GA 合成阻害剤であるウニコナゾール-P を処理することで抑制され種子数が増加する (Kataoka *et al.*, 2008)。同様に、*pat-2* 変異を導入した単為結果性トマト ‘ルネッサンス’ では、雄側の要因ではなく雌側の要因 (花粉管の伸長抑制) により、採種時に有種子果率の低下と一果実当たりの種子数の減少がみられる。この問題は GA 合成阻害剤パクロブトラゾール (Paclobutrazol, PAC) 処理により回復することが報告されている (大川, 2011)。これらの報告は、*pat-2* 変異による雌側の要因に由来した採種性の問題に、GA シグナルが関与していることを支持する。しかしながら、採種性に関わるような因子の GA シグナルによる制御機構は明らかにされていない。

2-4 GA と着果以降の果実発達

GA は着果のみならずそれ以降の果実肥大に対してもポジティブな効果を持つ。例えば、後述する GA 不活化遺伝子 *GA2 oxidase (GA2ox)* をトマト果実特異的に過剰発現した場合、果実サイズが野生型に比べて縮小する (Chen *et al.*, 2016)。また、PAC 処理により GA 合成を阻害すると果実の肥大が抑制される (Serrani *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2016)。それに対して、前述の通り GA 処理によりトマトやブドウなど多くの作物で果実肥大が促進される (図 2B)。このように、GA が果実肥大までの果実発達において重要な役割を

担っていることが明らかにされてきている。その一方で、トマトやブドウでは、肥大過程の果実への GA 処理によって着色が抑制されることが報告されている (Kondo and Kawai, 1998) が、GA シグナルが果実の着色を含む成熟過程に対しどのような役割を持ち、どのような機構で関与しているのかを明らかにした研究は少ない。

3. GA 生合成及びシグナル伝達の分子機構

3-1 GA の生合成

現在までに同定されている 136 種の GA のうち、植物の GA シグナル伝達で活性を示すのは 4 種類 GA (GA_4 , GA_1 , GA_7 , GA_3) である。特に GA_4 と GA_1 は高い活性を示し、植物種によってどちらの活性型 GA が中心的な役割を担っているかが異なる。例えば、シロイヌナズナでは GA_4 、トマトでは GA_1 がメインの活性型 GA であると考えられている (Derckx *et al.*, 1994; Talón *et al.*, 1990; Bohner *et al.*, 1988; Koshioka *et al.*, 1994; Fos *et al.*, 2000; Serrani *et al.*, 2007)。植物では活性型 GA (GA_4 と GA_1) の合成は、GA20 oxidase ($GA_{20}ox$) 及び GA3 oxidase ($GA_{3}ox$) による段階的な反応によって起こる (図 3)。活性型 GA (GA_4 と GA_1) は $GA_{20}ox$ によって不活化され、それぞれ GA_{34} 及び GA_8 になる (Hadden and Thomas, 2012)。また、GA メチルトランスフェラーゼ (GAMT1 と GAMT2) によってメチル基を転移されることで、一時的に不活化されることも知られている (Varbanova *et al.*, 2007)。これらの GA 生合成遺伝子および不活化遺伝子の発現は様々な発達シグナルや環境シグナルによって調節されている (Sun, 2011a)。例えば、シロイヌナズナやトマトの茎頂分裂組織の未分化細胞領域では GA シグナルによる細胞分化誘導を抑制するために、クラス 1 Knotted-like homoeodomain タンパク質 (クラス 1 KNOX) と呼ばれる転写因子によって $GA_{20}ox$ の発現が抑制されている (Sakamoto *et al.*, 2001; Hay *et al.*, 2002)。また、ジャガイモではクラス 1 KNOX である POTATO HOMEODOMAIN 1 (POTH1) と BELL1-like homoeodomain タンパク質 (BELL) の一つである StBEL5 が $StGA_{20}ox1$ のプロモーターに結合することで発現を促進している (Chen *et al.*, 2004a; Lin *et al.*, 2013)。

一方、トマトの着果では、受粉・受精に引き続いて GA 生合成遺伝子 [ent-copalyl diphosphate synthase (CPS) や $GA_{20}ox$] の発現上昇が誘導されることで GA 含量が増加し、子房の肥大に重要な GA シグナルを引き起こされる (Serrani *et al.*, 2007a; Pattison *et al.*, 2015)。

以後、本論文では特別なことわりがある場合を除いて、ジベレリン (GA) と表記した時は活性型 GA (GA₁ および GA₄) を指すものとする。

3-2 DELLA タンパク質の機能調節機構

現在までに明らかになっている植物における GA シグナル伝達機構を以下に記す。GA シグナル伝達では GA 応答を抑制的に制御する転写因子様タンパク質 DELLA と、GA を介した DELLA の分解機構が中心的な役割を担っている。また、*DELLA* 遺伝子の変異体は「緑の革命」でのイネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシやブドウなど多くの作物の収量向上に大きく貢献しており、農学的な観点からも *DELLA* は重要な遺伝子である (Peng et al., 1999; Boss and Thomas 2002; Chandler et al., 2002; Gubler et al., 2002; Itoh et al., 2002; Lawit et al., 2010)。

次に、*DELLA* の機能、分解機構および安定性等の調節機構についての知見を述べる。

DELLA は自身の分解機構に重要な領域 (GA 感知ドメイン) と、他のタンパク質との相互作用に重要な領域 (GRAS ドメイン) を有する (図 4)。GA 感知ドメインには 3 つのサブドメイン (*DELLA* ドメイン, KLE ドメイン, PolyS/T ドメイン) が含まれ、主に GA 受容体 GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) の結合とそれに付随する *DELLA* の分解に重要な領域である。また、GRAS ドメインには 5 つのサブドメイン (LHRI ドメイン, VHIID ドメイン, LHRII ドメイン, PFYRE ドメイン, SAW ドメイン) が含まれ、主に転写因子などの標的因子 (DELLA INTERACTING PROTEIN, DIP) との相互作用に重要な領域である。シロイヌナズナでは 5 つの *DELLA* 遺伝子 [*GA INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESOR OF gal-3 (RGA)*, *REPRESOR OF gal-3 LIKE proteins (RGL1, RGL2, RGL3)*] が、イネやトマトでは一つの *DELLA* 遺伝子 [*SLENDER RICE 1 (SLR1)* および *SIDELLA*] がそれぞれ同定されている (Peng et al., 1997; Wen and Chang, 2001; Lee et al., 2002; Tyler et al., 2004; Silverstone et al., 1997, 1998; Itoh et al., 2002; Jones, 1987; Jasinski et al., 2008)。*DELLA* は DIP との相互作用を介して、主に 2 つの機構から GA シグナル制御の働きを為す (図 5)。本論文では、便宜的にタイプ 1 及びタイプ 2 と呼ぶことにする。まずタイプ 1 は、*DELLA* が様々な DIP [PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), jasmonate ZIM-domain (JAZ), CONSTANS (CO), ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF) など] と結合し、DIP がターゲットとする DNA 領域への結合を阻害することで、下流のターゲット遺伝子の発現が変動する競争阻害的な機構である。その際、遺伝子発

現の変動は DIP が転写活性化能を有する場合は発現低下の方向へ、逆に転写抑制能を有する場合は発現上昇の方向へ作用する (Hauvermale *et al.*, 2012; Wang and Deng, 2011, 2014, 図 5). タイプ 2 は, DELLA が DIP と相互作用するが標的への DNA 結合能へは影響を与えず, むしろ転写活性を高めるコアクチベーターとして働き, 下流のターゲット遺伝子の転写を促進する機構である (図 5). DELLA のコアクチベーターとしての機能は, GA 生合成を高めるフィードバック反応としての一面も有する. GA シグナルと生理現象の関係を理解するためには, これらの機構によって調節されるターゲット遺伝子について明らかにすることも重要である. DELLA と GA 受容体 GID1 および DIP の相互作用では, 様々な翻訳後修飾 (リン酸化, SUMO 化, O-GlcNac 化, O-fucosyl 化) による DELLA の安定性や相互作用の親和性の調節も重要な働きをしていることも明らかになってきている. DELLA と DIP との相互作用は GA シグナルの中心的な仕組みであり, 現在までに明らかになっている相互作用因子についての詳細は後述する.

DELLA のユビキチン化を介した分解機構 (図 5)

前述の通り GA シグナルは, DELLA の存在量と活性化状態によって左右される. まず, DELLA の存在量の調節で重要な DELLA 分解機構について述べる. GA の受容体である GID1 タンパク質は, GA 非依存的な結合も報告されているが, 一般的に GA と結合することでアロステリックな効果による構造変化もしくは GA の緩衝剂的機能による立体構造の安定化により, DELLA と結合する (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2007; Murase *et al.* 2008; Shimada *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2013). そして, GID1 と結合した DELLA が F-box タンパク質 SLEEPY1 (SLY1) を含む Skp1/Cullin/F-box (SCF) E3 リガーゼ複合体によって認識されポリユビキチン化され, 26S プロテアソーム系を介して分解される (McGinnis *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009b; Wang and Deng, 2011). その結果, DELLA が結合して阻害していた標的因子解放されることで植物は GA 応答を示す (Hauvermale *et al.*, 2012). 一方, シロイヌナズナやイネでは, GA 非存在下で, DELLA タンパク質の分解に依存せず, GID1 が DELLA と結合するだけでも GA シグナル伝達が一部が活性化されることも報告されている (Ariizumi *et al.*, 2008; Ueguchi *et al.*, 2008). トマトでは配列情報から 3 つの GID1 様遺伝子 (*SIGID1b-1*, *SIGID1-b*, *SIGID1ac*) が見つかっているが, GA 存在下・GA 非存在下での SIDELLA と相互作用や *SIGID1* 遺伝子の発現パターンなどについての情報は得られていない. 本

研究では、SIDELLA と SIGID1s との相互作用についても第 2 章で検証した。

DELLA のリン酸化 (図 6A)

イネにおいて花成誘導が促進される変異体として同定された *Early Flowering 1 (EL1)* は、セリンスレオニンキナーゼの一つである casein kinase I をコードしており、イネの一つ存在する DELLA タンパク質 SLR1 のリン酸化に関与する (Dai and Xue, 2010). SLR1 のリン酸化は DELLA の安定性を高め、GA シグナルに対して抑制的に働く。イネの *SLY1* ホモログ *GID2* の機能欠損系統で SLR1 のリン酸化レベルが上昇したことから、リン酸化とユビキチン化は競合している可能性がある。その一方で、シロイヌナズナでは DELLA の脱リン酸化に関与する酵素 TYPE-ONE PROTEIN PHOSPHATASE 4 (TOPP4) が単離されている (Qin *et al.*, 2014). TOPP4 による DELLA の脱リン酸化は DELLA の安定性を低下させる。異なる植物での報告ではあるが、植物において DELLA のリン酸化は DELLA の安定性の調節に関与することが示唆される。現在までに、トマトにおいて DELLA のリン酸化・脱リン酸化反応に関与する遺伝子は単離されていない。

DELLA の SUMO 化 (図 6B)

ストレス条件下では植物の生育が抑制される (Achard *et al.*, 2006, 2008a, 2008b) が、それに寄与するメカニズムの一つとして、Small-Ubiquitin like modification (SUMO) 化による DELLA の高蓄積が知られている (Conti *et al.*, 2014). DELLA タンパク質には、様々な植物で高く保存された SUMO 化サイトを 1 カ所存在する。塩ストレス化で DELLA が蓄積する際に SUMO 化のレベルが上昇し、脱 SUMO 化反応を担う OVERLY TOLERANT TO SALT 1 (OTS1) SUMO protease の変異体では、DELLA の蓄積レベルが上昇する。その一方で、塩ストレス化では OTS1 のレベルが低下する (Conti *et al.*, 2008). さらに、GID1 は N 末端側に SUMO 認識部位を有しており、SUMO 認識サイトを欠損させた GID1 を発現させた植物体では、正常な GID1 を過剰発現させた系統と比べて DELLA の蓄積と GA 応答の低下が見られた。以上を踏まえると、DELLA の SUMO 化は GID1 と DELLA の相互作用を低下させ DELLA の分解抑制に関与すると考えられる。特に塩ストレスなどのストレス条件下では、OTS1 のレベル低下によって DELLA の脱 SUMO 化が抑えられ DELLA が高蓄積し、結果的に生育抑制が引き起こされることが示唆されている。

DELLA の O-GlcNAc 化と O-fucosyl 化 (図 7)

Zentella ら (2016) はシロイヌナズナが有する 5 つの DELLA タンパク質のひとつである RGA が O-linked N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 転移酵素 (OGT) SECRET AGENT (SEC) による糖鎖修飾を受けることを発見した。sec 変異体は 1996 年に GA 応答へ影響の出た変異体のひとつとして単離され、原因遺伝子は GA 応答遺伝子 SPINDLY (SPY) のパラログであることが確認されていたが、具体的な機能については明らかとなっていなかった。動物での研究から OGT ファミリーの酵素群は UDP-GlcNAc から基質となるタンパク質のセリンまたはスレオニン残基に O-GlcNAc monosaccharide を付加する反応 (O-GlcNAcylation, O-GlcNAc 化) を触媒することが知られている (Hanover *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012a; Nagel and Ball, 2014;). 生化学的なアプローチと遺伝学的なアプローチを組み合わせ、彼らは SEC による O-GlcNAc 化で DELLA の DIP との相互作用の親和性が低下し、GA 応答がポジティブに制御されることを証明した。一方で、SPY は SEC との配列の類似性に反して DELLA の O-GlcNAc 化反応を担っていないことも同時に示された。最近、同じ研究グループによって SPY は DELLA の O-linked fucosylation (O-fucosyl 化) を触媒することが明らかになった (Zentella *et al.*, 2017)。O-fucosyl 化は O-GlcNAc 化と同様に動物細胞やガンなどの研究でも注目される重要な糖鎖修飾の一つである (Miyoshi *et al.*, 2008; Miyoshi *et al.*, 2012; Tu *et al.*, 2017)。Zentella ら (2017) の報告によると、SPY による DELLA の O-fucosyl 化は、DELLA の DIP との相互作用の親和性を増加させ、GA 応答をネガティブに制御する。また、DELLA の O-GlcNAc 化及び O-fucosyl 化は競合的に生じることが示された。以上を踏まえると、SEC と SPY による 2 種類の糖鎖修飾を介して DELLA の作用のバランスが調節されていることが示唆されている。いずれについても、動物などで見られる修飾を取り除く反応を触媒する酵素は植物では単離されておらず、それらの単離が待たれている。

3-3 DELLA タンパク質と転写因子タンパク質の植物発達における役割 (図 8)

果実発達における GA シグナルの役割を理解するためには、DIP の機能を解明することが非常に重要である。DELLA は花成誘導関連転写因子 [FLOWERING LOCUS C (FLC), CO, SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL), WRKY] (Xu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017), 二次細胞壁関連転写因子

NAC29/31 (Huang *et al.*, 2015), 鉄イオン (Fe²⁺) 輸送関連転写因子 FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR (FIT) (von Wieren and Bennett, 2016; Wild *et al.*, 2016) などとの相互作用を介して植物の生理応答を制御することも明らかになってきているが、ここでは果実発達でも重要な細胞伸長や器官の老化などに直接関わる DIP に着目し、シロイヌナズナでの報告を中心に述べる。

3-3-1 タイプ 1 機構の標的因子

光シグナルと DELLA の相互作用

GA は光形態形成と密接な関係がある。光形態形成の一例としては、暗所で植物の伸長が促進され葉緑体の発達は抑制される一方で、明所で植物の伸長が抑制され葉緑体の発達が促進される現象が挙げられる。この現象において転写因子である PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs) が重要な役割を担う (Leivar and Monte, 2014)。また、暗所では植物体中の GA 含量が増加し DELLA が分解されることで伸長が促進され、明所では GA 含量が減少し DELLA が蓄積することで伸長が抑制される (Achard *et al.*, 2007)。この光形態形成と GA 応答の共通した伸長制御機構に、DELLA と光シグナルの重要転写因子である PIF3 及び PIF4 の相互作用が寄与する (Feng *et al.*, 2008; de Lucas *et al.*, 2008)。GA 非存在下では、DELLA が蓄積し PIFs と結合し DNA への結合を阻害することで光応答に関係する転写応答を抑制される。それに対して、GA 存在下では、DELLA の分解が促進され PIFs が解放されることで、PIFs は本来の転写活性を発揮し下流の光応答に関係する転写応答が促進される。また、近年 DELLA が PIFs のタンパク質分解を促進することも報告されている (Li *et al.*, 2016)。

ブラシノステロイド (Brassinosteroid, BR) シグナルとの関係

ブラシノステロイド (Brassinosteroid, BR) は植物のステロイドホルモンの一種であり、光や温度によって調節される実生の成長の制御などに働く (Wang *et al.*, 2012)。例えば、BR 生合成やシグナル伝達の変異体の実生では、暗所で通常引き起こされる黄化現象 (胚軸の伸長、子葉の展開の抑制、葉緑体発達の抑制等) が抑制される (Li *et al.*, 1996)。BR は細胞膜に存在する BR 受容体 BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 (BRI1) によって受容され (Li and Chory, 1997; Wang *et al.*, 2012)、下流の転写因子 BRI1-EMS-SUPPRESSOR1/BRASSINAZOLE-RESISTANT2 (BES1/BZR2) および BZR1 の脱リン酸

化を促し、核内へ移行した BES1 および BZR1 によって BR 応答遺伝子の発現が誘導される。BR 応答遺伝子の中には DELLA を介した GA シグナルによって制御される細胞伸長の促進に働く転写因子 PACLOBUTRAZOL-RESISTANT (PRE) ファミリーも含まれる (Lee *et al.*, 2006). 近年の研究により, DELLA は BZR1 と相互作用して BZR1 の DNA への結合を阻害し, 細胞伸長などの BR シグナルによって誘導される BR 応答を抑制することが明らかになった (Bai *et al.*, 2012a, 2012b). このことは, DELLA が BR シグナルと GA シグナルのクロストークにおいて重要な役割を担っていることを示す。

クロマチンリモデリング因子の一つである PHOTOMORPHOGENIC1 (PKL/EPP1) (Ogas *et al.*, 1999) は, PIF3 および BZR1 と直接相互作用しターゲット遺伝子領域の H3 ヒストンの 27 番目リジン残基のトリメチル化修飾 (H3K27me4) を阻害することで細胞伸長関連遺伝子の発現を誘導する (Zhang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014). 興味深いことに, PIF3 および BZR1 と相互作用する DELLA は, PKL/EPP1 とともに直接相互作用しこの機構を阻害する (Zhang *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Aux シグナルとの関係

Aux シグナル伝達では, 転写因子 AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) がターゲット遺伝子 (オーキシン応答遺伝子) の転写調節領域に存在する Aux 応答配列 (Auxin responsive element, AuxRE) へ結合し転写調節を行うことが中心的なメカニズムである。ARF ファミリーには, 転写促進活性を有する転写促進型 ARF と転写抑制活性を有する転写抑制型 ARF が存在する (Ulmasov *et al.* 1999; Zouine *et al.*, 2014). また, ARF ファミリーは転写抑制因子である AUX/IAA タンパク質との相互作用を介した調節の有無によっても分類される (Tiwari *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2001). 特に, AUX/IAA による ARF の調節機構は Aux シグナルでも大きな役割を持つ。Aux レベルが低い状態では, AUX/IAA が蓄積し ARF の転写活性を阻害する。一方で, 生合成や輸送の促進により Aux の濃度が高まると, Aux 受容体 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1) が受容し, TIR1 を含む SCF^{TIR1} E3 リガーゼ複合体が AUX/IAA をポリユビキチン化させることで, 26S プロテアソーム系を介したタンパク質分解が誘導される (Darmasiri *et al.*, 2005; Kepinski and Leiser, 2005; Maraschin *et al.*, 2009; Calderón Villalobos *et al.*, 2012). その結果, ARF が解放され本来の転写活性を発揮し, 下流のオーキシン応答遺伝子の発現を調節する (Worley *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 2001; Tiwari *et al.*, 2003).

興味深いことに、シロイヌナズナの研究で DELLA (RGA) が転写活性促進型 ARF に分類される AtARF6, AtARF7, および AtARF8 との相互作用によって DNA への結合を阻害し, Aux シグナルを抑制することが報告されている (Oh *et al.*, 2014). この DELLA と ARF の相互作用を介した下流遺伝子の発現調節は, 細胞伸長制御における GA シグナルと Aux シグナルのクロストークに関わる転写調節機構の一例である.

これまでに, トマトの着果へ ARF 遺伝子および AUX/IAA 遺伝子が関与することが証明されている. 例えば, トマトの転写促進型 ARF の一つである SIARF7 の発現を抑制すると, GA 生合成が促進され単為結果が誘導される (Zouine *et al.*, 2014; de Jong *et al.*, 2007). また, 葉と花器官で高い発現を示す AUX/IAA 遺伝子である SHAA9 の発現抑制もしくは機能欠損によっても単為結果が誘導される (Wang *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2011). これらの報告からトマトの着果現象において, ARF 遺伝子および AUX/IAA 遺伝子を介した Aux シグナルの制御が重要な役割を持つことが支持されている. トマトで発見されている 21 個の SIARF (Zouine *et al.*, 2014) と SIDELLA との相互作用は報告されていないが, AtARF8 のホモログである SIARF8A を過剰発現することで単為結果が誘導されることが報告されており (Fu, 2013), 着果での GA シグナルと Aux シグナルのクロストークへの関与が示唆される.

エチレン (Ethylene, ET) シグナルとの関係

果実の成熟にエチレンが重要なことはよく知られているが, 着果時雌蕊での ET の重要性も報告されている. 例えば, 篠崎ら (2015) によって, トマトの着果時期雌蕊において ET は GA 合成を抑制し, 受粉後に誘導される Aux シグナルによって ET シグナルが抑制されることで GA 合成及び GA 応答が誘導されることで着果が起きるというモデルが示されている. また, 通常着果時や GA 処理による単為結果時に ET 関連遺伝子の発現が低下する (Vriezen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009a; Pattison *et al.*, 2015). さらに, シロイヌナズナでは未受粉雌蕊の胚珠内部で開花後に合成される ET が, 胚珠の老化の制御に関与することが報告されている (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010).

はじめに ET のシグナル伝達系についてシロイヌナズナの研究を中心に概説する. ET のシグナル伝達では, 1) 受容体による ET の受容, 2) 受容体の相互因子のリン酸化反応, 3) マスター転写因子 ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3) の調節, 4) エチレン応答遺伝子の発現調節, と階層的で複雑な制御機構が存在することが明らかになってきて

いる (Ju and Chang, 2015). 特に DELLA との関係では, ET 応答のマスター転写因子とそれによって誘導される 2 次的な転写因子が重要である. ETHYLENE RECEPTOR 1 (ETR1) に代表される 5 つの ET 受容体は小胞体膜上に局在して, 下流因子の CONSTITUTIVE RESPONSE1 (CTR1) や ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2) と複合体を形成している. ET 受容体の機能は幾つかのコファクター [銅イオン輸送タンパク質, RESPONSIVE TO ANTAGONIST1 (RAN1); cytochrome b5 (Cb5) と REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1 (RTE1)] による調節を受け一部はトマトでも機能が保存されていることが示されている (Hirayama *et al.*, 1999; Woeste and Kieber, 2000; Binder *et al.*, 2010; Resnick *et al.*, 2006, 2008; Dong *et al.*, 2008, 2010; Barry and Giovannoni, 2006). また, ARABIDOPSIS HIS PHOSPHOTRANSFER (AHP) のリン酸化を介した情報伝達経路の存在も示唆されている (Scharein *et al.*, 2008; Scharein and Groth, 2011) が, 詳細な説明はここでは省略する. 受容体は ET 非存在下で CTR1 のリン酸化酵素ドメイン (Kinase domain, KD) を未知のメカニズムで活性化し, それによって EIN2 の C 末端側がリン酸化される (Chen *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012). リン酸化によって EIN2 の機能は阻害され, F-box タンパク質 ETHYLENE INSENSITIVE2 TARGETING PROTEIN1 (ETP1) と ETP2 により認識され 26S プロテアソーム系を介して分解される (Qiao *et al.*, 2009). 同時に, 核内ではマスター転写因子の EIN3 が F-box タンパク質 ETHYLENE INSENSITIVE3 BINDING F-BOX1 (EBF1) 及び EBF2 によって認識され, 26S プロテアソーム系を介して分解される (Guo and Ecker, 2003; Potuschak *et al.*, 2003; Gagne *et al.*, 2004; Binder *et al.*, 2007; An *et al.*, 2010). これにより, 下流の遺伝子の発現が抑制されることで ET 応答が見られない. これに対して, ET 存在下では, 受容体による CTR1 の活性化が抑えられ EIN2 のリン酸化も同時に抑制される. リン酸化のなくなった EIN2 の細胞質側領域は何らかのプロテアーゼによって切断され, 切断された EIN2 の C 末端側領域 (C-EIN2) は核内へ輸送される (Chen *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2012; Ju *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012). C-EIN2 は核内で EBF1 及び EBF2 の翻訳を抑制し存在量を低下させ, 結果的に EIN3 が蓄積して ETHYLENE RESPONSIVE FACTORS (ERFs) に代表される下流の遺伝子の発現を誘導する (An *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015; Merchante *et al.*, 2015). ERFs はさらに二次的にエチレン応答遺伝子の発現を促進あるいは抑制する. 興味深いことに C-EIN2 は直接的にヒストンのアセチル化の調節へも関与することが近年報告されている (Zhang *et al.*, 2016, 2017).

先述のように、EIN3 は ET シグナルのマスター因子として働く。シロイヌナズナの DELLA (RGA, GAI) は、EIN3 と EIN3-like1 (EIL1) の DNA 結合ドメイン (200 - 500 aa) と相互作用して、EIN3 がターゲット遺伝子のプロモーター領域へ結合するのを阻害する (An *et al.*, 2012). これは、GA 処理によって EIN3 下流のターゲット遺伝子 *HLS1* の発現が誘導されることから支持される。一方で、トマト雌蕊では *SIEIN3* の発現は開花後に未受粉の場合では上昇し、受粉もしくはトマトの *SIDELLA* 遺伝子の変異体 *procera* (*pro*) の単為結果時には発現が上昇しないことから、GA シグナルによって *SIEIN3* が転写レベルで制御されている可能性がある (江面, 未発表).

さらに、EIN3 の下流で働く ERF/AP2 転写因子ファミリーの内の幾つかのメンバーと DELLA が相互作用することが報告されている (Marín-de la Rosa *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2016). シロイヌナズナでは 122 個の ERF/AP2 ファミリー遺伝子が発見されている (Nakano *et al.*, 2006). Marín-de la Rosa ら (2014) の報告によると、シロイヌナズナの ERF メンバーの一つである RELATED TO APETALA2.3 (RAP2.3) が GAI と相互作用することが報告されている (Marín-de la Rosa *et al.*, 2014). RAP2.3 は、ERF/AP3 ファミリーのスレス応答に重要な VII サブファミリーに含まれる転写活性化因子である (Nakano *et al.*, 2006; Gasch *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017). DELLA は RAP2.3 と直接的にタンパク質間相互作用することで RAP2.3 の DNA 結合を妨げ、RAP2.3 の下流遺伝子の発現を抑制し、ET 応答として代表的な実生のフック形成に参与している。また、Zhou ら (2016) によって、ERF サブファミリー VIII-B-1a に属している AtERF11 と DELLA の相互作用が示されている。RAP2.3 は転写活性化因子であるのに対して、AtERF11 は転写抑制ドメイン EAR モチーフ (DLNxxP; McGrath *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006) を有する転写抑制因子である (Li *et al.*, 2011). RGA 及び GAI は AtERF11 とそのホモログ (AtERF4, AtERF8, AtERF10) とのタンパク質間相互作用を示す一方で、それらと近い別のサブファミリー VIII-B-1b に属している AtERF88 とは相互作用を示さないことから、DELLA が特定の ERF グループとある種の選択性を持って相互作用をすると考えられる。AtERF11 を過剰発現すると、ET 生合成に重要な *ACC SYNTHASE* (*ACS*) 遺伝子の発現が抑制される一方、GA 生合成遺伝子の発現が上昇して、活性型の GA₄ 含量が増加する。Arabidopsis eFP browser を用いた発現データの分析から、AtERF11 は ET によって発現が誘導されていた (江面, 未掲載). 以上から、AtERF11 は ET 反応のフィードバックシグナルとして、ET 応答を抑制的に制御し、結果的に GA 生合成へもポジティブな影響をもたらす因子

と考えられる。さらに、*AtARF11* が過剰発現された変異体 *erf11-ID* と、GA による分解を受けない変異型 *della* を過剰発現させた形質転換体 *rga-Δ17* を交配した場合、*rga-Δ17* で見られる強い矮化形質が緩和されることが示されている。これは、*AtARF11* が ET シグナルの抑制に働くと同時に、*DELLA* と相互作用することで *DELLA* の下流遺伝子の発現抑制にも関わることを示唆する。*DELLA* によって、*AtERF11* のターゲット遺伝子の転写活性化に関与するかは今後検証が必要とされる。これらの知見は ET と GA シグナルのクロストークを支持する一例である。

ジャスモン酸 (Jasmonic acid, JA) シグナルとの関係

JA は植物の防御応答や葯の発達に必要な植物ホルモンである (Westernack and Hause, 2013)。JA シグナルは、受容体である CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1)、中心的な転写因子 Myc-related transcription factor 2 (MYC2) ファミリー、また MYC2 ファミリーと相互作用して転写活性を阻害する Jasmonate ZIM-domain protein (JAZ) によって調節されている (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007)。

DELLA は JA シグナルの抑制因子である JAZ と相互作用することで、防御応答と成長のバランスを調節することが示されている (Huot *et al.*, 2014; Major *et al.*, 2017)。*DELLA* は、GA 非存在下で JAZ と相互作用することで、JAZ による MYC2 の抑制を阻害する。また、GA 存在下では *DELLA* が分解されることで JAZ が解放され MYC2 の転写活性を阻害し、JA シグナルが抑制され防御応答が抑制される (Hou *et al.*, 2010)。これに加えて、JAZ9 と RGA の相互作用が RGA と PIF3 の相互作用と拮抗的に生じることから、JAZ-DELLA-PIF によるシグナルが防御応答と成長のバランスの調節に関与すると考えられている (Yang *et al.*, 2012)。*DELLA* と JAZ が相互作用する一方で、*DELLA* は MYC2 自身とも相互作用をすることも報告されている (Hong *et al.*, 2012)。

JA シグナルは花器官の発達において、葯の発達で重要な役割を持つことが多くの植物で報告されている一方で、トマトでは葯の発達に加えて JA が胚珠の発達にも関与する (Dobritsch *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2004)。トマトの *COI1* ホモログ (*SICOI1*) の機能欠損変異体では、タネなし果実が形成されることが報告されている (Li *et al.*, 2004)。近年、トマトの研究から、JA シグナルは果実成熟においてリコペン合成に関与することが報告されている (Liu *et al.*, 2012b)。加えて、シロイヌナズナでは JAZ が EIN3 とのタンパク間相互作用を介して、エチレンシグナルを抑制的に制御することも知られている

(Zhu *et al.*, 2011). GA シグナル下流でエチレンシグナルが抑制されること、DELLA と JAZ が相互作用することを踏まえると、DELLA-JAZ-EIN3 を介した GA-JA-ET のシグナルクロストーク機構の存在も示唆される。

3-3-2 タイプ 2 機構の標的因子

GA 応答のフィードバック機構

植物が発達の中で GA シグナルのバランスを保つためには、GA シグナルによる GA 合成のフィードバック制御が重要である。GA 含量が低い場合、DELLA は DNA 結合因子である GAI-ASSOCIATED FACTOR1 (GAF1) を含む INDETERMINATE1 DOMAINS (IDDs) ファミリーのタンパク質と SAW ドメインを介して相互作用し、コアクチベーターとして IDDs が結合する *GA20ox* や *GA3ox* などのターゲット遺伝子の発現を促進する (Yoshida *et al.*, 2014; Fukazawa *et al.*, 2014, 2017)。一方で、GA 含量が増加して DELLA の分解が進んだ場合、IDDs は TOPLESS-RELATED (TPL) や SCARECROW-LIKE 3 (SCL3) などのコリプレッサーと結合することでターゲット遺伝子の発現を抑制する (Fukazawa *et al.*, 2014)。

サイトカイニンシグナルおよびアブシジン酸シグナルとの関係

DELLA のコアクチベーターとしての働きは、様々な生理現象で GA と拮抗的な役割をするサイトカイニン(Cytokinin, CK) およびアブシジン酸 (Abscisic acid, ABA) のシグナル伝達でも見ることができる。興味深いことに、GA シグナルの抑制因子である DELLA は、CK および ABA シグナルの活性化に働く転写因子と相互作用することでそれぞれのホルモンの応答遺伝子の発現を促進することが明らかにされてきた (Marín-de la Rosa *et al.*, 2015; Piskurewicz *et al.*, 2008)。例えば、DELLA (GAI, RGA) は CK シグナルに関与する転写因子 ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) と相互作用し、コアクチベーターとして CK 応答遺伝子の発現を促進する (Marín-de la Rosa *et al.*, 2015)。また、シロイヌナズナの種子発達で重要な役割をする DELLA タンパク質 RGL2 は、ABA シグナルに関与する転写因子 ABA-INSENSITIVE 3 (ABI3) および ABI5 と相互作用して、下流の ABA 応答遺伝子の発現を促進し、ABA 応答を促す。この機構は、種子の発芽を抑制し、休眠状態の維持に働く (Piskurewicz *et al.*, 2008)。

3-4 DELLA タンパク質と非転写因子タンパク質の植物発達における役割

PREFOLDIN (PFD) と DELLA の相互作用

DELLA は多くの転写因子群と相互作用する一方で、細胞骨格の配向性の決定にかかわる因子の一つである PFD と相互作用することが報告されている (Locascio *et al.*, 2013). ストレス条件下など植物が成長を抑制したい場合に DELLA が蓄積すると、PFD は DELLA と相互作用することで細胞質から核内へ輸送される。そして、PFD の本来の機能である細胞質での微小管の配向決定における役割が抑制され、そのため異方的な細胞伸長が妨げられる。一方で、GA が合成され DELLA の分解が進むと PFD は細胞質で本来の機能を発揮するようになり、伸長方向に対して垂直に微小管が整列し、異方的な細胞伸長が誘導される。興味深いことに動物や酵母の研究では、PFD ファミリーに属するタンパク質はここで挙げた微小管の配向性決定のみならず、転写調節にも関与することが示されている (Millán-Zambrano and Chávez, 2014; Millán-Zambrano *et al.*, 2014). DELLA によって発現調節される遺伝子が PFD によっても同時に制御されている時かどうかは検証が必要である。

3-5 トマトの *SIDELLA* 変異体 *procera* について

以上のように植物の発達において DELLA は DIP との相互作用を介して様々な生理現象の調節において重要な役割を担っている。トマトのゲノム中には、イネと同様に DELLA タンパク質をコードする遺伝子が 1 つのみ (*SIDELLA/PROCERA*) 存在し、他の植物と同様 GA シグナルを抑制的に制御する。そのため、機能欠損型の変異体 *procera* (*pro*) や当研究室で単離された別アレルの *procera2* (*pro2*) あるいは *SIDELLA* 発現抑制系統は茎の徒長と単為結果性を示す (Bassel *et al.*, 2008; Jasinski *et al.*, 2008; Marti *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012) (図 9A, B, C)。また、強い表現型を示す *pro* 変異体では果実の着色の遅延もしくは成熟の遅延が確認されている (図 9D)。したがって、栄養器官や花器官の発達に加えて果実発達においても、*SIDELLA* を介した GA シグナルが重要な役割を担っていると考えられる。また、GA 処理をした野生型トマト及びゲノム編集により *SIDELLA* の GRAS ドメインを欠損させた個体 (*pro*^{ΔGRAS}) の実生を用いたトランスクリプトーム解析から、GA によって制御される遺伝子のうち最大 95% は *SIDELLA* 依存的に制御されていることが示唆されている (Liven *et al.*, 2015)。シロイヌナズナでは 5 つの DELLA が、それらの発現パターンの違い、3 つの GID1 との親和性の違い、DIPs

との親和性の違い，そして DIPs の発現パターン等が複雑に関係し合うことで，異なる組織の発達や異なる環境シグナルへの応答が調節されている．一方で，トマトには DELLA が 1 遺伝子のみであり，異なる生理現象の制御には DIP 側の要因が大きな役割を持つと考えられる．従って，着果や成熟など特定の組織で特徴的な生理現象の制御には，組織特異的性の高い発現パターンを示す DIPs との相互作用が関与するのではないかと考えられる．しかし，現在までにトマトにおいて SIDELLA と相互作用する遺伝子は報告されていない．

以上，GA シグナルのメカニズムはシロイヌナズナで解明が進められているが，トマトにおいては知見が乏しい．例えば，着果の成立における SIDELLA を介した GA シグナルによる細胞種レベルでの転写動態の変化はこれまで評価されていない．また，GA 受容体 GID1 を介した DELLA の分解機構は GA シグナルの中核であるにもかかわらず，トマトではこれまで評価されていない．さらに，トマトの SIDELLA と相互作用する DIPs はこれまで単離されていない．

4. 本課題の目的と概要

4-1 目的と意義

果菜類のモデル植物であるトマトを材料に，果実発達における GA シグナルの役割を明らかにすることを目的とした．特に，果実において GA シグナルにより制御される遺伝子群の同定と，その発現制御機構を担う SIDELLA 相互作用因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINS, DIPs) の単離を実施した．本研究の達成目標として，(1) トマト果実発達における組織特異的な GA シグナル経路を明らかにする，(2) トマト果実発達における GA シグナルへ関与する新規 DIPs を単離する，(3) トマト果実発達における新規 DIPs の機能を明らかにする，(4) SIDELLA と新規 DIPs の相互作用の果実発達における役割を理解する，の以上 4 つを設定した (図 10)．本研究の成果はトマト果実発達における GA の役割を分子レベルで明らかにするための基盤になりうる研究である．

4-2 研究の概要

本研究では，第 1 章で，GA シグナルの組織特異的な働きを明らかにするためトランスクリプトームデータを用いた解析を行った．初めに，着果時の果実発達に着目し雌蕊

特異的に発現している遺伝子 (*Pistil-specifically expressed genes, PSGs*) の選抜を実施した。次に、選抜した *PSGs* の中で *SIDELLA* を介した GA シグナルによって制御される着果メカニズムへ関与する因子の有無を検証するため、*pro* 変異体の着果時の雌蕊におけるトランスクリプトームデータを用いた解析を実施した。その結果、着果時の GA シグナルによって制御される *PSGs* を単離し、その多くが抑制的な制御を受けていることを明らかにした。しかし、同遺伝子群の GA シグナルによる発現制御機構を理解するためには、*SIDELLA* の相互作用因子の単離が必須と考えた。

そこで、第 2 章では、果実発達における *SIDELLA* による GA 応答の制御機構を明らかにするため、*SIDELLA* の新規相互作用因子の単離を試みた。まず、トマトの *SIDELLA* タンパク質と分解機構を明らかにすること及びタンパク間相互作用の実験系を確立することを目的に、トマトにおける GA 受容体 *SIGID1* と *SIDELLA* の相互作用の検証を行った。次に、トマト果実の mRNA より作製した cDNA ライブラリーを用いて *SIDELLA* の新規相互作用因子候補 (*CANDIDATE OF DELLA INTERACTOR, CDIs*) を選抜した。第 1 章で獲得した発現データ等を用いて *CDIs* のトマトにおける発現を解析し、果実発達期に機能する因子を抽出した。最後に、抽出した候補遺伝子と *SIDELLA* の相互作用を酵母ツーハイブリッド法 (*Yeast two hybrid, Y2H*) 法を用いて検証し、新規 *SIDELLA* 相互作用タンパク質を単離した。

第 3 章では、第 2 章で単離した新規 *SIDELLA* 相互作用タンパク質のトマトの発達における役割を明らかにするため、形質転換体解析及び Y2H 実験を実施した。特に、果実発達における GA シグナルの分子機構を明らかにするため、転写因子をコードする *CDI5* に着目して解析を進めた。*CDI5* 遺伝子の発現が抑制された系統の解析から果実発達における役割を検証した。

最後に総合討論は、*SIDELLA* と *CDI5* の相互作用を中心に果実発達における *SIDELLA* を介した GA シグナルの役割について議論した。

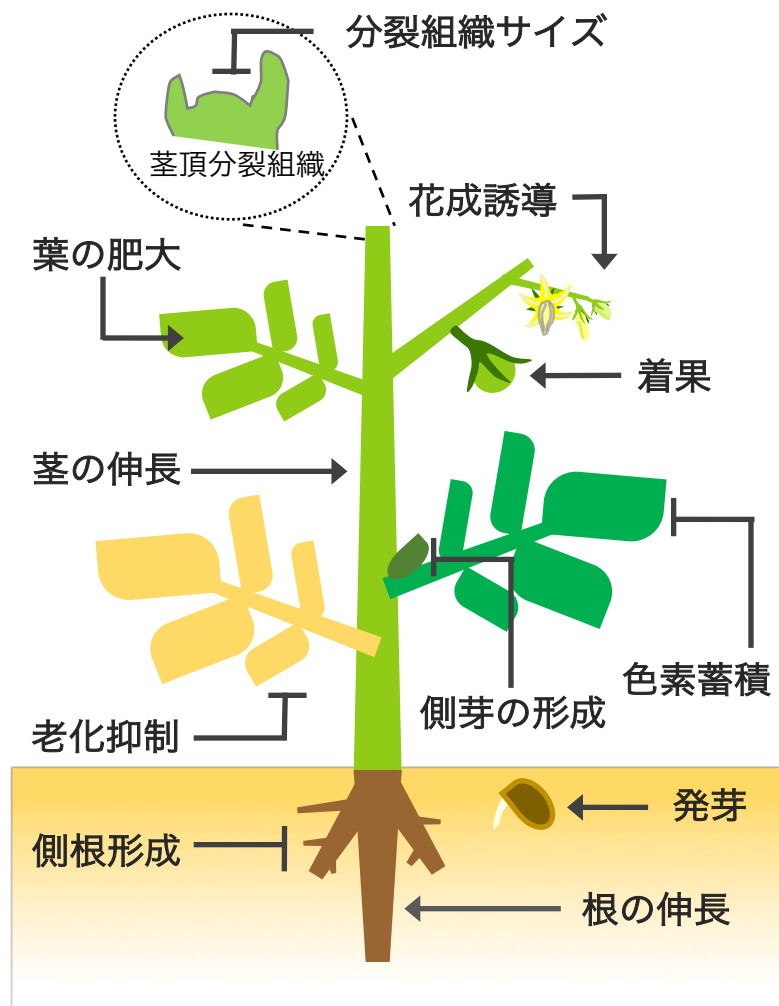
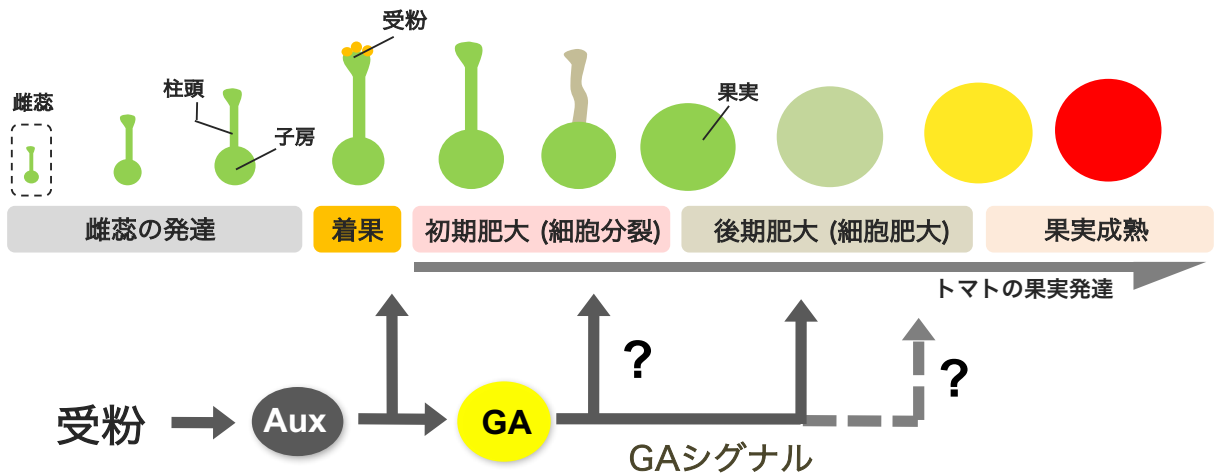


図1. ジベレリン (Gibberellic acid, GA) の植物発達における役割

GAは種子の発芽、根の伸長、茎の伸長、葉の肥大、着果、花成などを促進する。一方で、GAは側根形成、老化、側芽の形成、分裂組織のサイズ、クロロフィル・カロテノイド・アントシアニンなどの色素蓄積を抑制する。

A)



B)

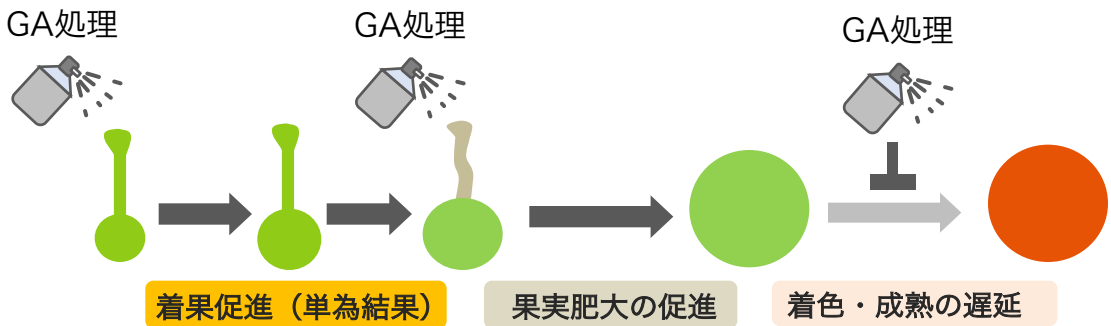


図2. ジベレリン (Gibberellic acid, GA) の果実発達における役割

A) トマトの果実発達過程. 受粉・受精によって子房内部で誘導されるオーキシン (Auxin, Aux) シグナルによって, GAの生合成が促進される. 合成されたGAは下流のシグナルを誘導して子房の細胞肥大を促す. Auxにより誘導される活発な細胞分裂に続いてGAによって細胞肥大が引き起こされることで, 子房から果実への転移が起こる. これを, 着果と呼ぶ. 未受粉のGA処理は受粉・受精に依存しない果実形成 (単為結果) を引き起こす. 一方, GAの果実成熟に対する役割はほとんど明らかになっていない. B) GA処理の果実発達への効果. 開花時期子房へのGA処理は受粉・受精に依存しない着果を促進する. 肥大初期の果実へのGA処理は果実肥大を促す.

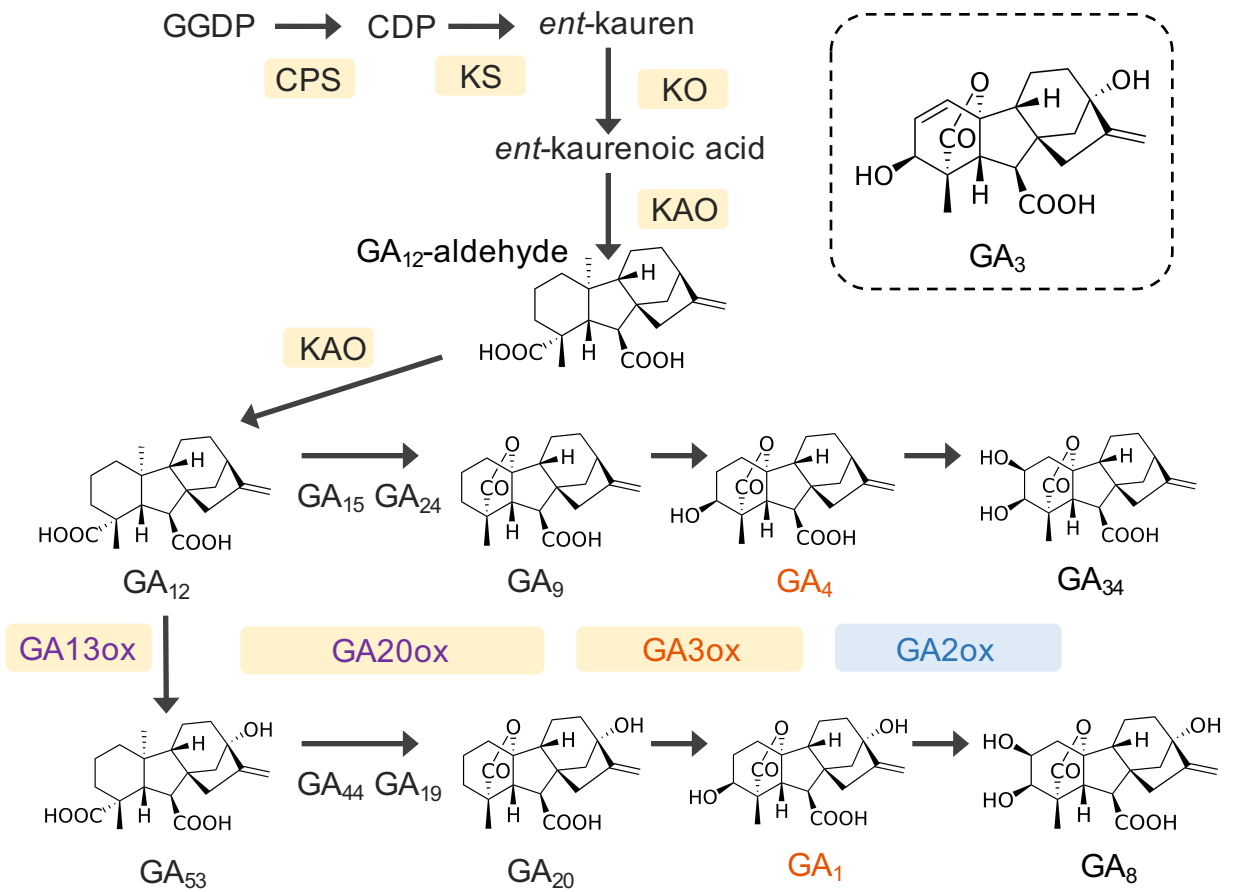
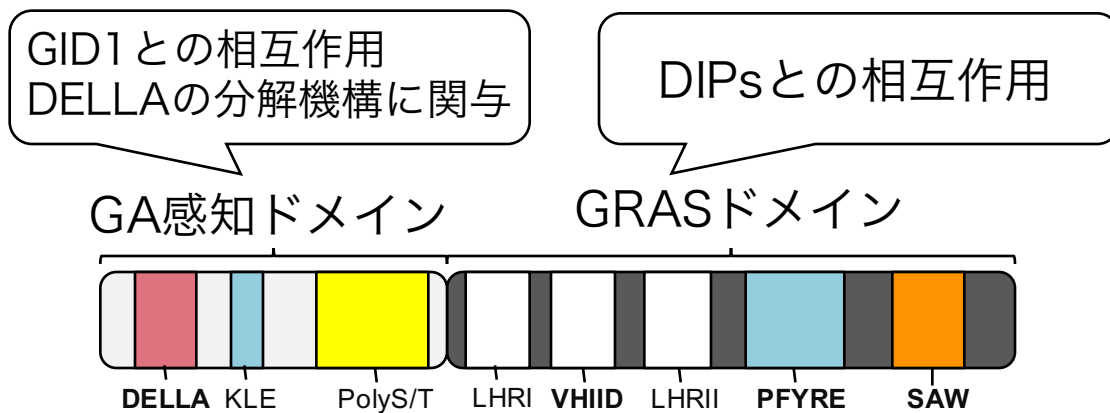


図3. ジベレリン (Gibberellic acid, GA) の代謝経路

植物で活性を示すGAは4種類 (GA₄, GA₁, GA₇, GA₃) が単離されており, 特にGA₄とGA₁は高い活性を示す. また, GA₄とGA₁のいずれがメインの活性型GAかは植物によって異なる. 植物では中心的な活性型GA (GA₄とGA₁)の合成は, GA20 oxidase (GA20ox) 及びGA3 oxidase (GA3ox) による段階的な反応によって起こる. また活性型GA (GA₄とGA₁)はGA2 oxidase (GA2ox) によって不活化され, それぞれGA₃₄及びGA₈になる. 合成GAであるGA₃はホルモン処理などに一般的に用いられる.

A)



B)

ドメインを
区別する場合



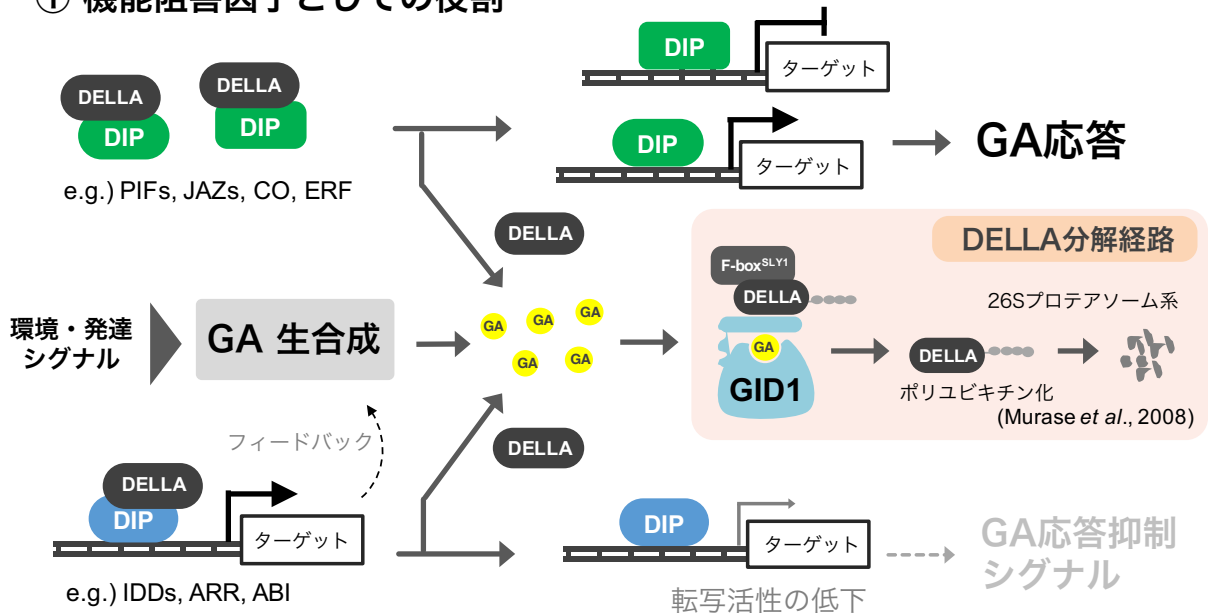
ドメインを
区別しない場合



図4. DELLAタンパク質の機能ドメイン

A) DELLAの2つの機能ドメインとサブドメイン. DELLAはジベレリン (Gibberellic acid, GA) 感知ドメイン (GA perception domain) 及びGRASドメイン (GRAS domain) によって構成される. GA感知ドメインは3つのサブドメイン (DELLAドメイン, KLEドメイン, PolyS/Tドメイン) を含み, 主にGA受容体GIBBERELLIN INSENSITIVE DOWARF 1 (GID1) の結合とそれに付随するDELLAの分解機構に重要な領域である. また, GRASドメインは5つのサブドメイン (LHRIドメイン, VHIIIDドメイン, LHRIIドメイン, PFYREドメイン, SAWドメイン) を含み, 主に転写因子などの相互作用因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINS, DIPs) とのタンパク質間相互作用に重要な領域である. また, GID1との相互作用の安定化に関わることも示唆されている. B) DELLAタンパク質の本論文での表記.

① 機能阻害因子としての役割

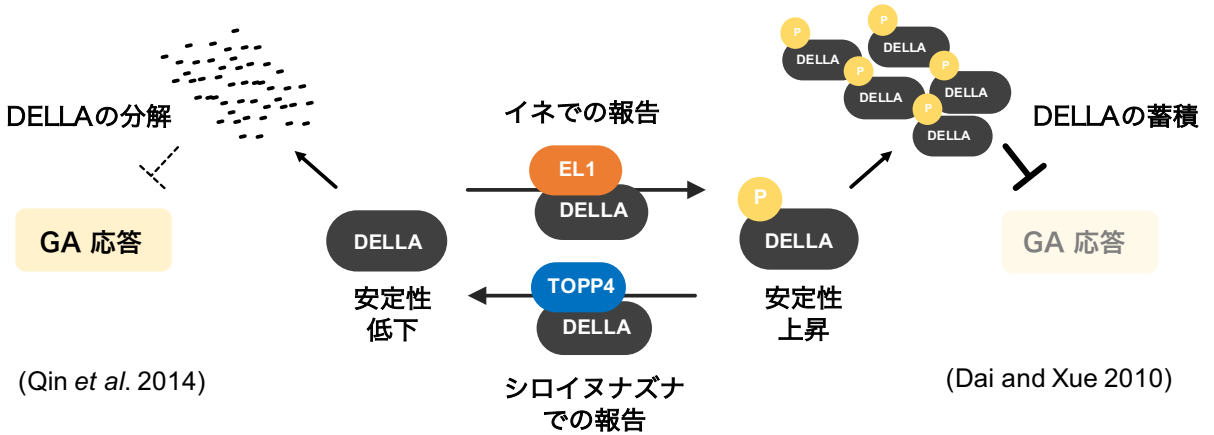


② コアクチベーターとしての役割

図5. DELLAタンパク質の機能

DELLAは自身の分解機構に重要なジベレリン (Gibberellic acid, GA) 感知ドメインと、相互作用因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINs, DIPs) とのタンパク質間相互作用に重要なGRASドメインを有する (図4)。DELLAはDIPとの相互作用を介して、主に2つの機構からGAシグナルを制御する。本論文では、便宜的にタイプ1 (隔離剂的機能) 及びタイプ2 (コアクチベーター機能) と呼ぶ。タイプ1の機能では、GA非存在下でDELLAが蓄積すると様々なDIPs (PIF, JAZ, CO, ERFなど: 図10に詳細) と結合し、相手がターゲットとするDNA領域への結合を阻害する。一方、GAが合成されるとDELLAはGAを受容したGID1とF-boxタンパク質 (SLY1) を含むSkp1/Cullin/F-box (SCF) E3リガーゼ複合体によりポリユビキチン化され、26Sプロテアソーム系を介して分解される。それに伴いDIPはDELLAから解放され本来の機能を発揮する。結果として、DIPがターゲットとする遺伝子の発現が変動する。その変動はDIPが転写活性化因子の場合、発現低下の方向へ、転写抑制因子の場合発現上昇の方向へ作用する (Hauvermale *et al.*, 2012; Wang and Deng 2014)。タイプ2の機能では、GA非存在下でDELLAが蓄積するとDIP (IDD, SPL, ARR, ABIなど: 図10に詳細) のDNA結合能へは影響を与えずに結合し、コアクチベーターとしてDIPの転写活性を高める。一方、GA存在下ではDELLAが分解され転写活性が低下することで、下流のターゲット遺伝子の発現は低下する。

A)



B)

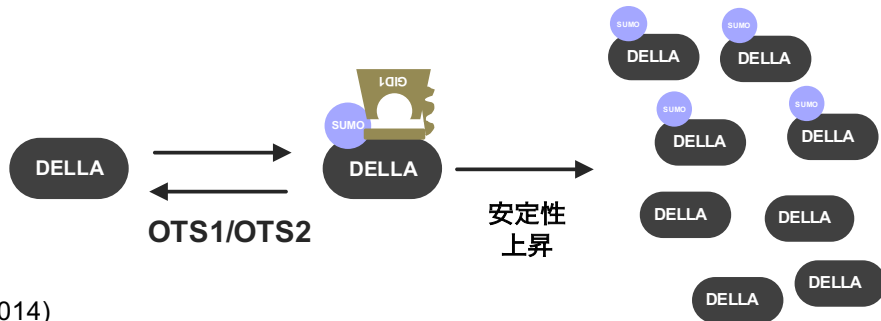


図6. 翻訳後修飾による DELLAの安定性の調節

A) リン酸化による DELLAの安定性の調節. イネの Early Flowering 1 (EL1) は, イネに1つ存在する DELLAタンパク質 SLR1のリン酸化 (P) に関与する (Dai and Xue *et al.*, 2010). SLR1のリン酸化は DELLAの安定性を高め, ジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルに対して抑制的に働く. その一方で, シロイヌナズナの TYPE-ONE PROTEIN PHOSPHATASE 4 (TOPP4) は DELLAの脱リン酸化に関与する (Qin *et al.*, 2014). TOPP4による DELLAの脱リン酸化は DELLAの安定性を低下させ, GAシグナルに対して促進的に働く. 異なる植物での報告ではあるが, 植物において DELLAのリン酸化は DELLAの安定性の調節に関与することが示唆される. 現在までに, トマトでは DELLAのリン酸化・脱リン酸化反応に関与する遺伝子は単離されていない. B) Small Ubiquitin-like modification (SUMO) 化による DELLAの安定性の調節 (Conti *et al.*, 2014). DELLAの SUMO化は DELLAの安定性を高める. これには GA受容体である GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) との相互作用が関与すると示唆されている. OVERLY TOLERANT TO SALT 1 (OTS1) による脱SUMO化は DELLAの安定性を低下させる. 塩ストレス下では OTSの発現レベルが低下し, DELLAの安定性が高まることで GAシグナルが抑制され植物の生育が抑制されると考えられている.

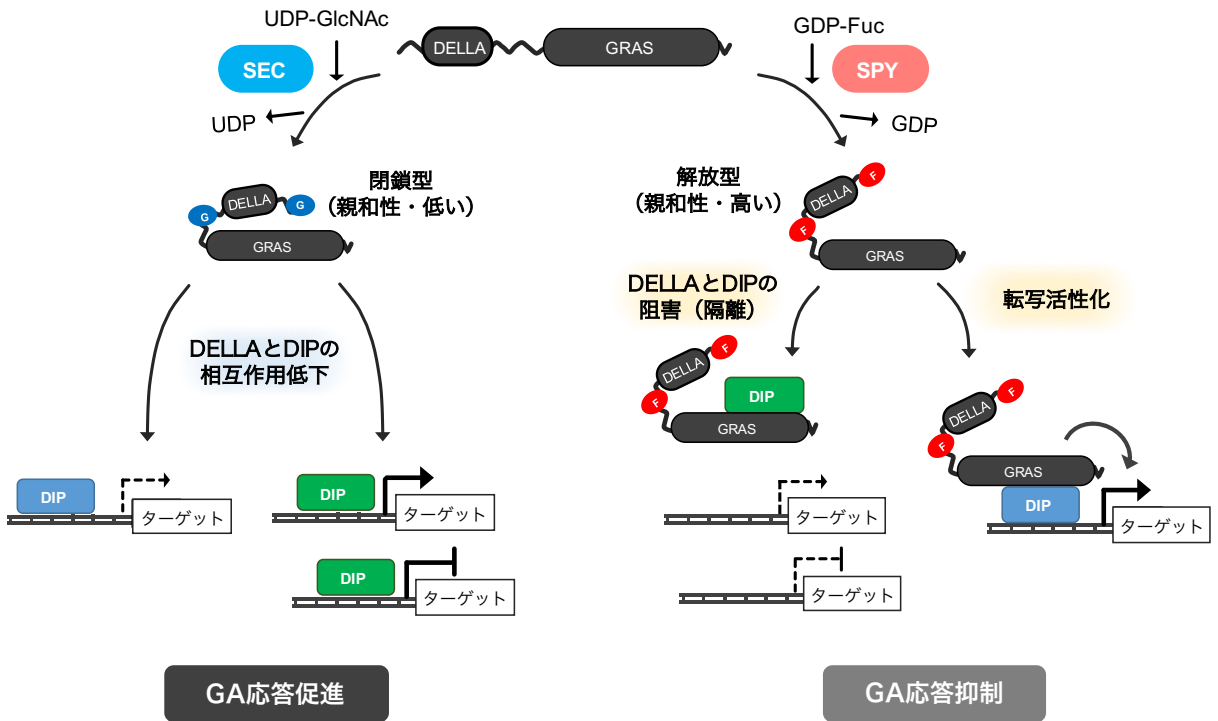


図7. O-GlcNAcylation及びO-fucosylationによるDELLAの親和性の調節

DELLAと相互作用因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINs, DIPs) との親和性は、2種類の糖鎖修飾により調節される。O-linked N-アセチルグルコサミン (O-GlcNAc) 転移酵素であるSECRET AGENT (SEC) によってDELLAはO-GlcNAc化される (Zentella *et al.*, 2016)。SECによるO-GlcNAc化は、DELLAのDIPとの相互作用の親和性を低下させ、ジベレリン (Gibberellic acid, GA) 応答をポジティブに制御する。O-linked フコシル基 (O-fucose) 転移酵素 SPY によってDELLAはO-linked fucosylation (O-fucosyl化) される (Zentella *et al.*, 2017)。SPYによるDELLAのO-fucosyl化は、DELLAのDIPとの相互作用の親和性を増加させ、GA応答をネガティブに制御する。DELLAのO-GlcNAc化及びO-fucosyl化は競合的に起こり、SECとSPYによる2種類の糖鎖修飾はDELLAの作用のバランスを調節していることが示唆されている。一方で、動物などで報告されているこれらの糖鎖修飾を取り除く反応を触媒する酵素は、植物では未だ単離されていない。O-GlcNAc基 (G)、O-フコシル基 (F)。

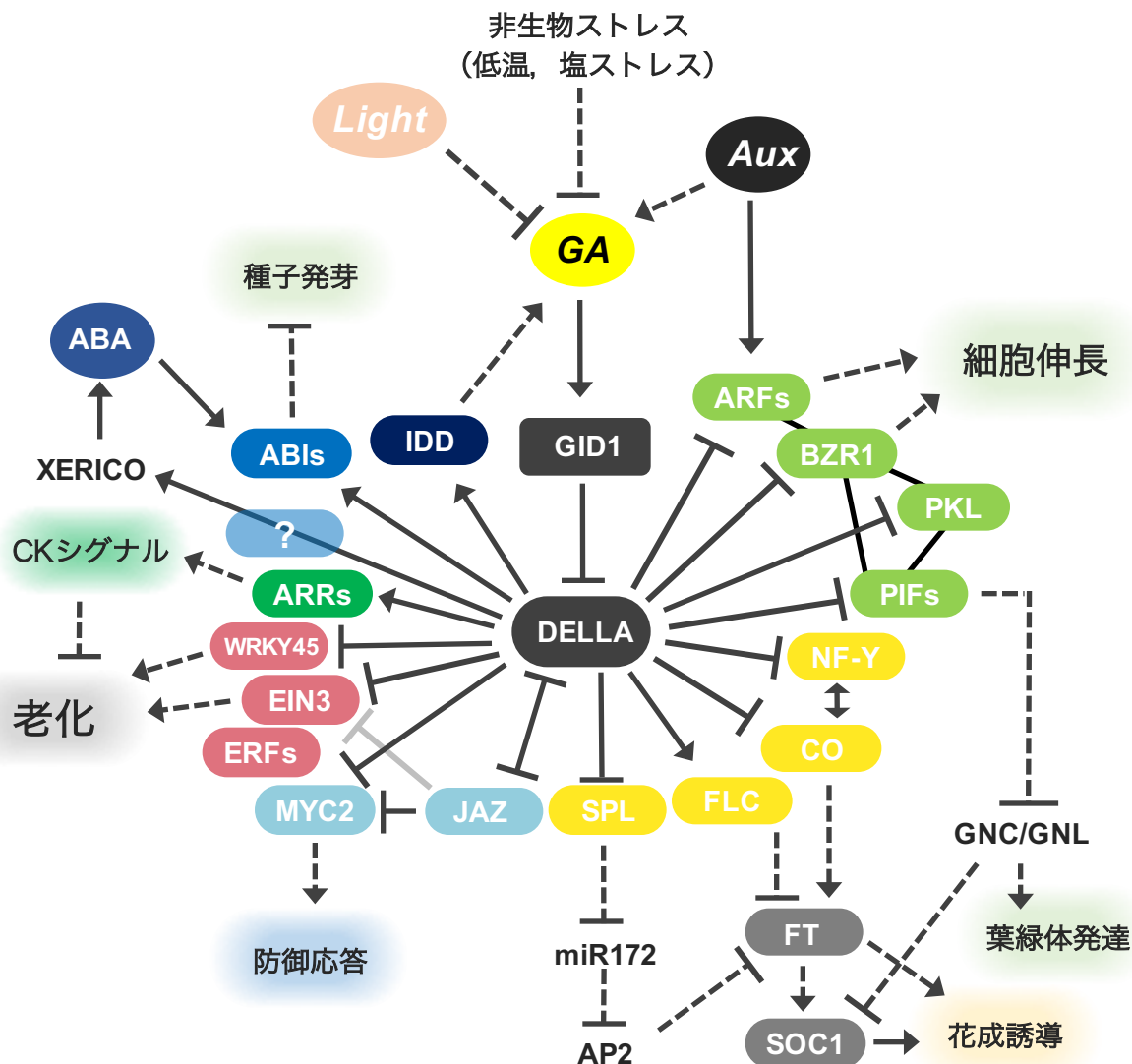
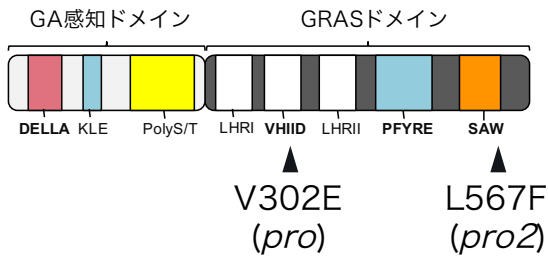


図8. DELLAとDIPの相互作用を介した様々なシグナルのクロストーク

DELLAは様々な転写因子と相互作用することで、標的因子の転写活性を抑制もしくは促進し、下流の生理現象を制御する。DELLAはジベレリン (Gibberellic acid, GA) を受容したGA受容体GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) に認識され、Skp1/Cullin/F-box (SCF) E3リガーゼ複合体によってポリユビキチン化される。その後、26Sプロテアームによって分解される。AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1), PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs), PICKLE (PKL) とDELLAの相互作用は、細胞伸長の制御に関与する。また、PIFsとの相互作用はGATA NITRATE-INDUCIBLE CARBON-METABOLISM INVOLVED (GNC) やGNC-LIKE (GNL)の発現を調節を介した、葉緑体発達や花成誘導への関与も示唆される。NUCLEAR FACTOR-Y (NF-Y), CONSTANS (CO), FLOWERING LOCUS C (FLC), SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) とDELLAの相互作用は、microRNA172 (miR172), FLOWERING LOCUS T (FT) やSUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION 1 (SOC) の発現を制御し花成誘導へ関与する。JASMONATE-ZIM DOMAIN (JAZ), MYC-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 2 (MYC2), ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3), ETHYLENE RESPONSE FACTORS (ERFs) とDELLAの相互作用は、防御応答と生育のバランスの調節や老化の調節へ関与する。コアクチベーターとしてINDETERMINATE DOMAIN (IDD), ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS (ARRs), ABA-INSENSITIVES (ABIs) と相互作用することでGA合成のフィードバック・CKシグナルの促進・ABAシグナルの促進へ関与する。オーキシン (Auxin, Aux), アブシジン酸 (Abscisic acid, ABA), サイトカイニン (Cytokinin, CK), Ring-type E3 ligase (XERICO), APETARA2 (AP2).

A)



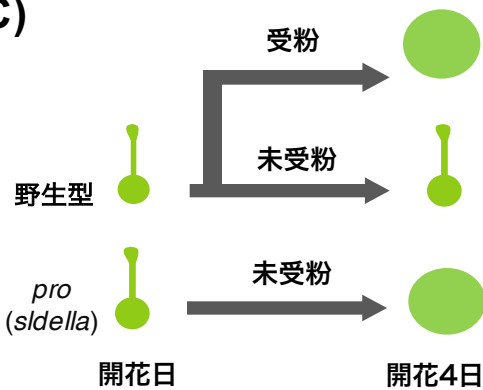
B)



野生型

*pro2**pro*

C)



D)



野生型

*pro2**pro*

図9. トマト *SIDELLA*変異体の特性

トマトには一つの*DELLA*遺伝子 (*SIDELLA*) が存在する。 *SIDELLA* の機能欠損により恒常的なジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルが誘導される。 A) トマトのGAシグナル調節因子*SIDELLA*の変異体である*procera* (*pro*) と表現型の弱いアレル*procera2* (*pro2*) の変異箇所。 バリン, V; グルタミン酸, E; ロイシン, L; フェニルアラニン, F。 B) *pro*変異体の徒長。 スケールバー = 1 cm。 C) *pro*変異体は受粉に依存しない果実形成 (単為結果性) を示す。 *SIDELLA*依存的なGAシグナルは、着果に対して重要な役割を担う。 D) *pro*変異体は果実の着色もしくは成熟の遅延を示す。 *SIDELLA*依存的なGAシグナルの果実成熟への関与を示唆する。 スケールバー = 1 cm。

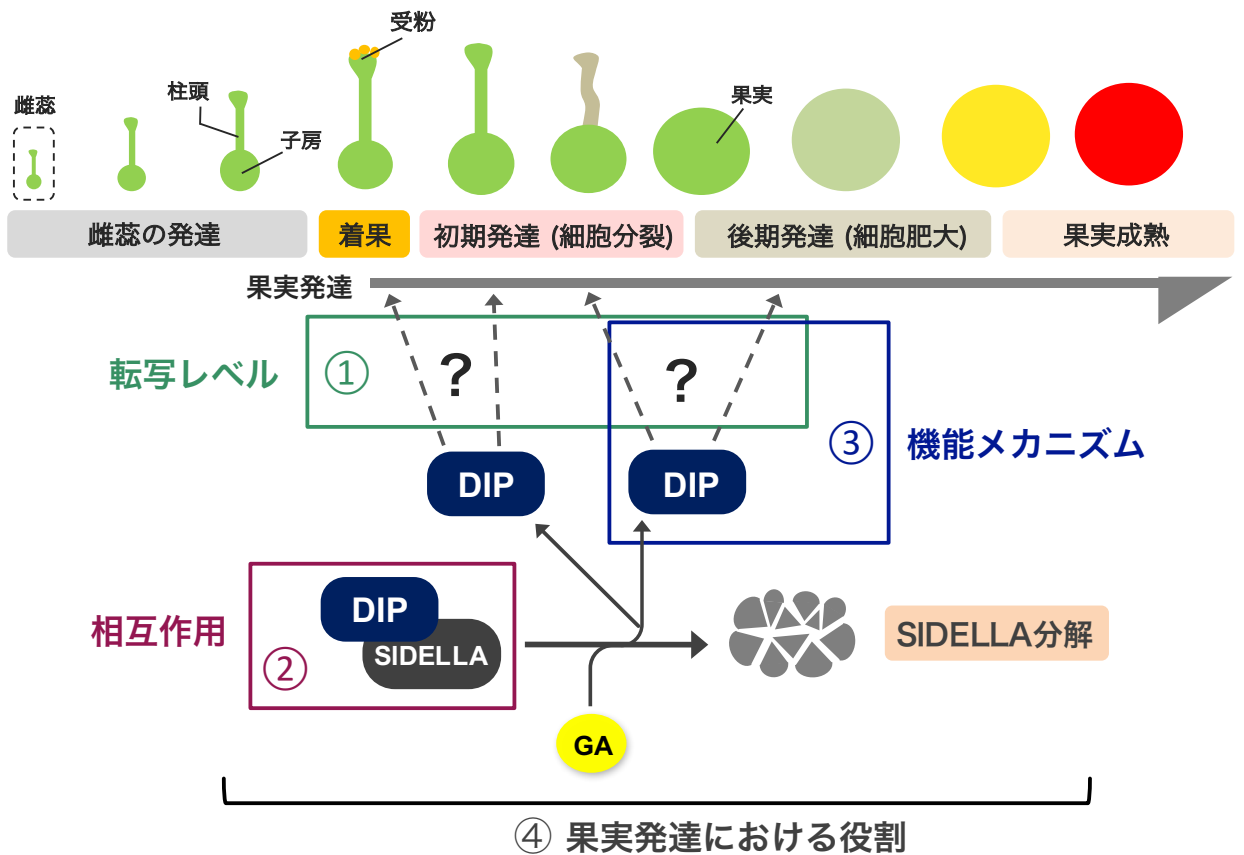


図10. SIDELLAを介したジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルの果実発達における役割の理解に向けて
 SIDELLAを介したGAシグナルの果実発達における役割を理解するために、本研究の達成目標として、(1) トマト果
 実発達における組織特異的なGAシグナル経路を明らかにする、(2) トマト果実発達におけるGAシグナルへ関与す
 る新規SIDELLA相互作用因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINS, DIPs) を単離する、(3) トマト果実発達における
 新規DIPsの機能を明らかにする、(4) SIDELLAと新規DIPsの相互作用の果実発達における役割を理解する、の以上4
 つを設定した。

第 1 章

果実発達期における GA シグナル

下流遺伝子の探索

第1章 果実発達期における GA シグナル下流遺伝子の探索

1-1 緒言

ジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルの果実発達における役割を理解する上で、GA 応答遺伝子の同定は重要な意味を持つ。本章では、果実発達初期 (着果) おいて GA シグナルで調節される遺伝子群の単離を目的とした。

これまでにトマトの果実発達、特に着果における GA の役割を明らかにするため、GA の下流で発現変動する遺伝子を網羅的に同定する複数の研究が報告されている (Vriezen *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2015)。例えば、*SIDELLA* 遺伝子の機能欠損型変異体である *procera* (*pro*) の開花前子房を用いたトランスクリプトーム解析により、着果直前の子房で *SIDELLA* によって制御される遺伝子群が調査されている (Carrera *et al.*, 2012)。また、これらの解析から、着果では GA シグナルを介して様々な植物ホルモンの代謝やシグナル伝達関連遺伝子群に加えて、糖代謝や光合成関連の遺伝子の発現がダイナミックに変化することも示されている。

そこで、本研究は雌蕊特異的発現遺伝子 (*Pistil-specific genes, PSGs*) に着目して、GA シグナルにより発現制御される遺伝子群の同定を目的とした。GA 生合成の活性化に起因する単為結果性を示すと考えられている *pat-2* 変異を持つ品種‘*Severianin*’や‘ルネッサンス’ (Fos *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2003; Olimpieri *et al.*, 2007; Serrani *et al.*, 2007)、また *pro* (Carrera *et al.*, 2012) は高い単為結果性に加えて、採種性の低下が生じることが報告されている。いずれも花粉管伸長の阻害や胚珠 (胚のう+珠皮)の発達への影響など、雌側の要因が関与することが示唆されている (Kataoka *et al.*, 2008; 大川, 2012; Carrera *et al.*, 2012)。育種の利用への観点では採種性は非常に重要な要素である。花粉管伸長の阻害や胚珠の発達への影響など採取性の低下をもたらす現象と *SIDELLA* を介した GA シグナルの関係の詳しいメカニズムは先行研究でもほとんど議論されていない。このメカニズムへ関与する遺伝子の単離の意味は大きいと考えられる。筆者らは先行研究で、雌蕊特異的な遺伝子発現調節ツールを作出することを目的に、トマトの雌蕊で優先的に発現している遺伝子を選抜した (江面, 2015)。そこで、本研究ではそのデータと *pro* の着果時期子房のトランスクリプトームデータ (篠崎ら, 未投稿) を用いて、*SIDELLA* を介した GA シグナルの関連した発現パターンを示す遺伝子が含まれるかを評価した。その結果、胚珠や種子で高い発現を示す遺伝子群の多くが GA シグナルによって調節されていることが見出された。詳細について以下に示す。

1-2 材料及び方法

1-2-1 雌蕊特異的遺伝子の選抜と発現組織の特定

先行研究で、トマト品種‘Micro-Tom’の16種類の異なる組織及び発達ステージのサンプルを用いたトランスクリプトーム解析から雌蕊で優先的に発現する遺伝子を選抜していた(江面,2015)。同研究では、多数の組織を用いたこと、解析コスト等の要因から各組織1サンプルずつでRNAシーケンシング(RNA-seq)を実施した。そのため選抜された遺伝子群には実際には雌蕊では発現していない遺伝子、もしくは特異性が低い遺伝子が含まれる可能性が考えられた。そこで、よりデータの正確性を高めることと、各遺伝子についての情報を増やすため、公共データベースで入手可能な別のRNAシーケンスデータを用いたバリデーションを実施した。具体的には先行研究で選抜された532遺伝子について、1)雌蕊での発現の確認、2)雌蕊以外の組織での発現の有無の再検証を行った。まず、雌蕊での発現の有無を確認するために、Pattisonら(2015)が報告したRNA-seq解析の公共データで、Reads per million mapped reads (RPM)値が2以上の遺伝子を絞り込んだ。続いて雌蕊以外の組織での発現の有無を確認するため、トマトの生殖器官・栄養器官を含む26種類の発現データで発現が認められた遺伝子のうち、9つの栄養器官でReads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads (RPKM)値が1未満の遺伝子を選抜した。最後に雌蕊で発現が確認された遺伝子群と、栄養器官での発現が認められなかった遺伝子群(RPKM<1)を比較して、2つのグループに共通して含まれる遺伝子群を雌蕊特異的遺伝子 [*Pistil-specific genes (PSGs)*]とした。

選抜したPSGsの特徴づけをするため、Pattisonら(2015)の雌蕊の組織別発現データを用いて各遺伝子が優先的に発現している組織を調べた。RPKM値を Log_2 変換し、MeV software (Howe *et al.*, 2011)でヒートマップを作成した。クラスタリングにはPearson correlation法を用いた。また、選抜したPSGsにどのような機能を持つ遺伝子が多く含まれているかを明らかにするため、AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>)を用いてGene Ontology解析を行った [False discovery rate (FDR) ≤ 0.05]。選抜したPSGsの着果との関連性を考察するため、オーキシン(Auxin, Aux)及びGAを処理したトマト雌蕊のRNA-seq解析の発現データ (Tang *et al.*, 2015)におけるPSGsの発現を調査した。

1-2-2 雌蕊特異的遺伝子の組織特異的発現の確認

選抜遺伝子の発現特異性を確認するため、胚珠もしくは胚で優先的に高発現している遺伝子をそれぞれ 5 個ずつ、また 3 つの転写因子について表 1-6 の条件に従い RT-PCR を実施した。発現解析に用いたプライマーは表 1-6 に示す。発現解析では、先行研究 (江面, 2015) で合成した 16 種類の異なる組織の cDNA サンプルを用いた。

1-2-3 GA 応答性雌蕊特異的発現遺伝子 (PS-GRGs) の抽出

GA シグナルに応答する果実発達関連遺伝子を選抜することを目的に、*pro* 変異体の着果時期の子房の RNA シークエンシングデータ (Shinozaki *et al.*, unpublished) を用いて、雌蕊特異的遺伝子 (表 1-1, Ezura *et al.*, 2017) の発現を調査した。*pro* で子房の肥大が顕著に見られる開花 4 日後の未受粉の子房において、同時期の野生型と比較して RPKM 値が 2 倍以上の発現差がある遺伝子群を GA 応答性遺伝子として選抜した。特に、雌蕊特異的遺伝子のうち着果に関連した GA 応答性を示したものを雌蕊特異的 GA 応答遺伝子 (*Pistil-specific GA-responsive genes; PS-GRGs*) とした。詳細な選抜基準については「1-3 結果及び小考察」に詳述する。

1-3 結果及び小考察

1-3-1 RNA-sequence データを用いた雌蕊優先的遺伝子の選抜

先行研究で ‘Micro-Tom’ の雌蕊で特異的な発現を示すものとして 532 個の遺伝子が選抜していたが (江面, 2015), 本研究では、公共データを活用することで発現特異性の高いと思われる 108 個の雌蕊特異的発現遺伝子 (*Pistil-specific genes, PSGs*) を選抜することができた (表 1-1, 図 1-2 B)。さらに、雌蕊の細胞種別 RNA-seq データ (Pattison *et al.*, 2015) の解析から、選抜された遺伝子の大半は、胚珠もしくは種子で高い発現を示すことが明らかになった (表 1-3, 図 1-3 A)。選抜された遺伝子のうち、13 遺伝子について RT-PCR により発現を確認したところ、雌蕊特異的な発現が確認されたことから、今回の選抜された遺伝子には発現の組織特異性が高い遺伝子が確かに選抜されたことを確認した (図 1-3 B)。発現の特異性が確認できた *Solyc05g005340* と *Solyc04g074320* はそれぞれシロイヌナズナの *INNOR NO OUTER (INO)* および *TRANSPARENT TESTA1 (TTI)* のホモログをコードしており、*INO* や *TTI* は胚珠や種皮の発達制御で重要な役割を持つことが示されている (Alvarez and Smyth, 1999; Villanueva *et al.*, 1999; Balasubramanian and Schneitz, 2000; Appelhagen *et al.*, 2011; Sagasser *et al.*, 2002)。これは今回のスクリーニン

グで PSGs が選抜できている事を支持する結果である。

次に、どのような機能を持つ遺伝子が多く含まれているかを検証するため、108 個の PSGs の中でアノテーションがつけられている遺伝子群について AgriGO を用いた Gene ontology 解析を実施した。その結果、”Carboxyesterase activity (GO:0004091)” に属する遺伝子が優位に多く含まれることが明らかになった (図 1-2 D)。具体的にはペクチンエステラーゼインヒビター (*Solyc02g069330*, *Solyc09g011280*, *Solyc09g0111290*), Pectinacetylerase (*Solyc10g050750*), GDSL lipase (*Solyc06g073100*) が含まれた (図 1-2 D 下)。ペクチンは、高等植物の主要な細胞壁構成成分の一つである。ゴルジ体で合成されたペクチンは、細胞壁へ輸送される前にペクチンメチル基転移酵素 (Pectin methyltransferase, PMT) によってメチル化される (Kauss *et al.*, 1967; Vannier *et al.*, 1992)。一方、ペクチンエステラーゼ (Pectin methylesterase, PME) はメチル化されたペクチンの脱メチル化反応を触媒する (Micheli *et al.*, 2001; Pelloux *et al.*, 2007; Jolie *et al.*, 2010)。脱メチル化されたペクチンのカルボキシ基はカルシウムやマグネシウムイオンと架橋構造を作り、ペクチンの強度が高まるとされる (Daher and Braybrook, 2015)。ペクチンエステラーゼインヒビター (PMEI) は PME に特異的に結合して、PME の活性を阻害する。Lionetti ら (2007) によると、シロイヌナズナで PMEI を過剰発現した植物体では、ペクチンのメチルエステル化の割合が 16%増加し、細胞伸長が促進されることで根が長くなることが報告されている。したがって、ペクチンのメチルエステル化の度合いは、細胞の拡張性 (Extensibility) と剛性 (Rigidity) のバランスを決定し、ひいては細胞の成長や形に影響を与える。トマトでは、着果時期の雌蕊で PME が恒常的に発現しているにもかかわらず、開花 1 日前から開花 3 日後でメチルエステル化ペクチンが増加するという果実の発達初期に急速なペクチン代謝の変動が報告されている (Gaffe *et al.*, 1997; Terao *et al.*, 2013)。着果時期の子房では、受粉前には細胞の発達が抑制され、受粉し着果のシステムがオンになると細胞分裂や細胞肥大が引き起こされることが知られている (Gillaspy *et al.*, 1993)。以上を踏まえると、今回単離された PMEI は PME を特異的に制御し雌蕊の細胞の分裂や肥大に影響を与えているかもしれない。その中で *Solyc02g069330* は Pectinestrace inhibitor ファミリーのサブグループに位置する Invertase inhibitor に近の配列のタンパク質をコードしていた。同グループに分類される *INVERTASE INHIBITOR 1 (INVINH1, Solyc12g099200)* は果実の発達初期で細胞壁型インベルターゼの活性を制御し、着果の誘導に重要な役割を持つことが示唆されている

(Hothorn *et al.*, 2004, 2010; Jin *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2015).

PSGs の多くはアノテーションの付けられていない機能未知遺伝子であったが、108 遺伝子のうち44個が200アミノ酸残基以下の小タンパク質をコードしていた (表1-4). ペプチドホルモンと呼ばれる小タンパク質 (200 アミノ酸残基以下) が、シグナル伝達分子として細胞間のシグナル伝達で重要な役割を担うことが、動物や菌類の研究から示されてきている (Hökefelt 1991; Mirabeau *et al.*, 2007). ペプチドホルモンは細胞外に分泌される特徴を持ち、細胞膜上でそれと結合し細胞内にシグナルを伝える受容体とセットで機能する (Yamaguchi *et al.*, 2016). 近年、植物でもペプチドホルモンが Aux や GA などの植物ホルモンと同様に植物の発達や環境応答などで重要な役割を持つことが証明され、多くのペプチドホルモンが単離されてきている (Ryan and Pearce 2001; Katsir *et al.*, 2011; Matsubayashi, 2011; Tavormina *et al.*, 2015; Yamaguchi *et al.*, 2016). 例えば、植物で始めて報告されたシステミンはトマトを含めたナス科植物の防御応答シグナルに関与する (Pearce *et al.*, 1991; Ryan and Pearce, 1998; Pearce and Ryan, 2003; Sun *et al.*, 2011b; Bubici *et al.*, 2017). また、*CLAVATA3 (CLV3)* に代表される CLE ペプチドファミリーは、茎頂分裂組織のサイズ決定など植物の様々な発達メカニズムに関与することが知られる (Yamaguchi *et al.*, 2016). また C-terminally encoded peptide (CEP) は植物の全身的な窒素要求シグナルとして働くことが報告されている (Tabata *et al.*, 2014; Okamoto *et al.*, 2016). ペプチドホルモンの可能性も考慮して、これらの遺伝子の機能を推定するためアミノ酸配列の情報をもとに配列の保存性や細胞内局在について調査した. その結果、特に、5つの遺伝子 (*Solyc11g012650*, *Solyc11g005540*, *Solyc11g005500*, *Solyc05g010190*, *Solyc06g075200*) が CLE などと同様に植物で研究が進んでいるシステインリッチペプチド (Cysteine rich peptides, CRPs) 様のタンパク質をコードしていることがわかった (図1-4). CRPs はペプチドホルモンのグループの1つで、約150アミノ酸残基以下のタンパク質でC末端側に分泌シグナル配列、N末端側に偶数個 (4, 6, 8個) の保存されたシステイン残基を持っている (Marshall *et al.*, 2011). 雌蕊での受精時の花粉管誘因に重要な LURE などが含まれる (Okuda *et al.*, 2009). 今回の単離した小分子タンパク質はそれらの特徴を満たしていた. また、CRP の受容体を含むロイシンリチリピートレセプターキナーゼ (LRR-RLK) 様のタンパク質をコードする遺伝子も2個含まれた (図1-4). 筆者らは、既に先行研究で開花時期の雌蕊で優先的に極めて高発現するナス科特異的な CRP を1つ (*PEPTIDE HORMONE-LIKE 1 (PEHL1)/OSP*) 同定しており (江面, 2015),

これらの遺伝子が雌蕊発達及び着果においてシグナル分子として働くかどうかは非常に興味深い点である。GA シグナルによって発現制御を受けることが示唆された遺伝子について 1-3-2 で詳述する。

1-3-2 RNA-seq データを用いた GA 応答性雌蕊特異的発現遺伝子の選抜

次に、単離された 108 個の *PSGs* の中で、GA シグナルによって制御され、着果時に変動する遺伝子を同定するため、篠崎ら (未発表) によって実施された *pro* 変異体の着果時の子房を用いた RNA-seq データでの発現パターンを調査した。開花日には *pro* 変異体と野生型の子房サイズに差は見られないが、開花 4 日後には未受粉の *pro* 変異体の子房が野生型と比べて有意に大きくなる (図 1-5A)。そこで、*pro* 変異体で見られる受粉非依存的な子房の肥大に関与する遺伝子発現の変化を調査するために、開花日と開花後 4 日の発現を比較した。そこで、野生型は開花日の子房 (D0)、開花後 4 日の受粉 (D4p) 及び未受粉の子房 (D4e)、*pro* 変異体からは開花日 (d0) 及び開花 4 日後の未受粉の子房 (d4e) の発現データを獲得した (図 1-5B)。この d4e は受粉非依存的に果実形成をした単為結果の子房である。まず、獲得した 5 点の遺伝子発現データの中で 108 個の *PSGs* の発現を確認した結果、72 遺伝子が 5 点のデータのうち 1 つ以上で RPKM 値 0.5 以上の値を示した (表 1-5, 図 1-5C)。これらの 72 遺伝子について以降の解析を行った。

次に、SIDELLA を介した GA シグナルによって制御されている *PSGs* を、各子房サンプル間の発現量 (RPKM) の比較によって調査した。1 つ目の基準として、GA シグナルを介した着果との発現パターンの関連性の有無を検証した。具体的には、着果との関連性が示唆される発現遺伝子群として 1) 肥大開始後に発現が制御される遺伝子群 (d0/D0 で差なし、かつ d4e/D0 で差あり、かつ d4e/D4e で差あり ; G1), 2) 開花時に既に GA による制御を受け果実肥大開始後も同様の制御を受ける遺伝子群 (d0/D0 で差あり、かつ d4e/D0 で差あり、かつ d4e/D4e で差あり ; G2), 3) GA によって発現が維持され、着果しない場合にのみ変化するパターン (d0/D0 で差なし、かつ d4e/D0 で差なし、かつ d4e/D4e で差あり ; G3) を考え、それぞれのパターンを示す遺伝子を調べ分類した。その結果、G1 グループに 25 遺伝子、G2 グループに 22 遺伝子、GK グループに 9 遺伝子が含まれた (表 1-5)。

さらに、着果に重要な遺伝子をより正確に選抜するために、SIDELLA を介した GA シグナルによって制御されている *PSGs* の中で、野生型の受粉を伴う着果時にも類似し

た発現パターンを示す遺伝子の選抜を試みた。まず、想定される発現パターンとして、着果の促進に関与する可能性のある発現パターンと、着果の抑制に関与する可能性のある発現パターンを考えた。具体的には、着果の促進に関与する可能性のある発現パターンとしては、着果時にのみ発現が変動するグループ [D4e/D0 で差なし、かつ D4p/D0 で差あり；増加 (F1+) または減少 (F1-)]、着果時に未受粉の場合と逆の変動を示すグループ [D4e/D0 で差あり、かつ D4p/D0 で差あり、かつ着果時と未受粉時が逆のパターン；増加 (F2+) または減少 (F2-)] が想定された。また、着果の抑制に関与する可能性のある発現パターンとしては、着果しない場合でのみ発現が変化し着果した場合には開花時での発現が維持されるグループ [D4e/D0 で差あり、かつ D4p/D0 で差なし；未受粉で増加 (F3+) または未受粉で減少 (F3-)] が想定された。これらのグループに分類される遺伝子を調査した結果、F1+に 4 遺伝子、F1-に 24 遺伝子、F2+に 5 遺伝子、F2-に 2 遺伝子、F3+が 2 遺伝子、F3-に 4 遺伝子が含まれた (表 1-5)。

最後に、選抜した遺伝子のリストを比較し、SIDELLA を介した GA シグナルによる発現制御を受け、かつ着果に関与する可能性を有する PSGs が 34 遺伝子選抜された (表 1-5, 図 1-5C)。これらの遺伝子を、 $d4e/d0$ の値から *pro* 変異体の着果時に発現が上昇する遺伝子 ($d4e/d0 > 2$) を UP、発現が低下する遺伝子 ($d4e/d0 < 0.5$) を DOWN、発現が変化しない遺伝子 ($2 > d4e/d0 > 0.5$) を KEEP と分類した。すべての基準を満たした 34 遺伝子は、/G1/F1-/DOWN へ 14 遺伝子 (グループ 1)、/G2/F1-/DOWN へ 8 遺伝子 (グループ 2)、その他のパターン (G2/F1-/KEEP と G3/F3+/KEEP へ 2 遺伝子ずつ、G2/F2-/KEEP, G3/F2-/KEEP, G2/F1+/KEEP, G1/F2+/UP, G3/F1+/KEEP, G2/F2+/KEEP, G3/F2+/KEEP, G3/F3-/KEEP へそれぞれ 1 遺伝子)(その他) に分類された (表 1-4)。以上から、SIDELLA を介した GA シグナル下で着果に関連して発現変動される PSGs では、GA シグナルによって抑制的な制御を受けるもの割合が高かった (約 67.7%) (図 1-5D, 6)。また、そのうち約 38.9%の遺伝子が開花時点で既に抑制的な制御を受け、約 61.9%の遺伝子が開花後に抑制的な制御を受けていた。開花後に着果に相関して抑制される遺伝子は、直接的に GA シグナルによって制御される場合、開花後に何らかのシグナルで誘導される転写抑制活性を有する DIP が存在すると考えられる。

グループ 1 に含まれた個別の遺伝子のうち幾つかについて以下に記す。まず、先にも触れたが、今回のスクリーニングから *INNER NO OUTER* のホモログ *SIINO* が単離された。*INO* は YABBY ファミリーの転写因子であり、胚珠の外珠皮の発達を調節する

(Villanueva *et al.*, 1999). シュガーアップル (*Annona squamosa*) のタネなし果実系統でも *INO* のホモログ領域が欠損していることが報告されている (Lora *et al.*, 2011). 最近, *SIINO* の mRNA がトマトの胚珠の外種皮で発現していることが *in situ* hybridization 法とプロモーターのレポーターアッセイから示された (Skinner *et al.*, 2016). また, 同論文内で蛍光タンパク質を融合させた *SIINO* タンパク質も外珠皮に蓄積することが確認された (Skinner *et al.*, 2016). さらに近年シロイヌナズナの研究で, 転写因子の一つである *KANADI* ファミリーに属する *ABERRANT TESTA SHAPE (ATS, At5g42630)* (McAbee *et al.*, 2006) が, *DELLA* と直接相互作用して *ATS-DELLA* 複合体を形成し, 胚珠の発達特に珠皮の形成の制御を行うことが報告された (Gomes *et al.*, 2016). *DELLA* が結合する配列の中には, *ATS* も属する *GARP-G2* ファミリーの転写因子が結合する配列も含まれたことから, *DELLA* は *ATS* と結合しコアクチベーターとして珠皮の発達に関与する遺伝子の発現を促進すると示唆されている (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014; Marín-de la Rosa *et al.*, 2015). その一方で, *SIDELLA* が胚珠及び種皮の発達に関わるどのような遺伝子を調節しているかは明らかにされていない. 本研究で *SIINO* の発現が *SIDELLA* を介した *GA* シグナルによって抑制されることが明らかになった. これは, *SIINO* は *SIATS-SIDELLA* 複合体により制御される可能性を示唆する.

次に, *Solyc02g069330* について記す. *Solyc02g069330* は Pectinestrase inhibitor ファミリーのサブグループに位置する Invertase inhibitor に相同性を示す配列のタンパク質をコードしていた. 同グループに分類される *INVERTASE INHIBITOR 1 (INVINH1, Solyc12g099200)* は果実の発達初期で細胞壁型インベルターゼの活性を制御し, 着果の誘導に重要な役割を持つことが示唆されている (Hothorn *et al.*, 2004, 2010; Jin *et al.*, 2009; Parmer *et al.*, 2015). *Solyc02g069330* の着果シグナルによる発現抑制は, Tang ら (2015) によって実施されたトマト子房の RNA-seq データの中でも確認された (図 1-7A). その結果では, 受粉, Aux 処理, 及び GA 処理により発現が抑制されていた. Aux 処理及び GA 処理で抑制されたということは, Aux の下流で GA が働くことを考慮すると, *Solyc02g069330* の発現は着果により誘導される GA シグナルによって抑制されると考えられる. さらに, 本研究で *pro* 変異体の雌蕊で発現抑制が確認された (図 1-6) ことから, *Solyc02g069330* は *SIDELLA* を介した GA シグナルによって下方制御されることが示唆される. *Solyc02g069330* は 1) 胚珠で発現すること, 2) 着果時に発現が抑制され未受粉時には発現が維持されること, 3) インベルターゼによるスクロースのグルコース

の分解は糖シグナルを高めること、4) 糖シグナルはエチレンを介した老化を抑制すること、5) 開花後の未受粉雌蕊では胚珠の老化が進む (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2010) ことを踏まえると、SIDEELLA を介した GA シグナルによる *Solyc02g069330* の抑制は、糖シグナルを介してエチレンシグナルを低下させることで胚珠の老化抑制に働くと考えられる (図 1-7B).

Solyc11g005540 は、胚珠内で精細胞と卵細胞の融合に関与するペプチドホルモンである EGG CELL 1 (EC1) と相同性を持つタンパク質をコードしている。*Solyc11g005540* の発現は、SIDEELLA に依存した GA シグナルによって開花前から抑制されていた (図 1-6). 本研究では、*Solyc11g005540* 以外にさらに 2 つの *EC1* 様遺伝子 (*Solyc11g005500*, *Solyc05g010190*) を単離した (図 1-4). *pro* 変異体での *Solyc11g005500* および *Solyc05g010190* の発現を確認したところ、両遺伝子とも開花時点で野生型と比べて半以下の発現量であった (表 1-5). RT-PCR による解析で、*Solyc11g005500* および *Solyc11g005540* の雌蕊特異的な発現が確認された (図 1-8A). 次に他のホモログがトマトゲノム中にあるかどうかを明らかにするため、シロイヌナズナで単離されている 5 つの *EC1* 遺伝子と今回単離した 3 つの *EC1* ホモログ遺伝子のアミノ酸配列を用いて BLASTP 検索を行ったところ、さらに 2 つの *EC1* 様遺伝子が発見された (図 1-8B). それらのアミノ酸配列を比較したところ、シロイヌナズナのメンバーで保存されている 6 つのシステイン残基が全て保存されていた (図 1-8C). *EC1* は胚珠の卵細胞から分泌され、精細胞と卵細胞の融合を促す。それに続くシグナルによって重複受精が抑制される (Sprunck *et al.*, 2012) (図 1-8D). *pro* 変異体では、今回発見した全ての *EC1* 様遺伝子の発現が開花前もしくは開花時点で野生型と比べて抑制されていた (図 1-8E). *pro* 変異体の子房での *EC1* 遺伝子群の発現抑制は、胚珠発達の阻害による形態的な変化の影響の可能性も考えられが、SIDEELLA を介した GA シグナルによる制御を示唆する。

その他には、*Solyc01g106730* が種子の胚乳発達において細胞化のタイミングの制御に重要な AGL63 のホモログをコードしていた (Kang *et al.*, 2008; Hehenberger *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2015, 2016). *Solyc06g070950* が ATP-binding cassette (ABC) transporter をコードしていた。*Solyc04g058040* はフェノール類を酸化する能力を持つ酸化酵素である Laccase をコードしていた。*Solyc10g044690* は Annexin をコードしていた。Annexin は動物界から植物界にかけて広く保存されていて、特に動物細胞の研究から膜輸送やイオン輸送、減数分裂シグナル、細胞骨格の再編成、DNA 複製など様々な機能を持つことが

示されている (Gerke and Moss, 2002). タバコやトウモロコシの卵細胞で発現し, 受精後の胚では発現が失われることが報告されている (Okamoto *et al.*, 2004; Ning *et al.*, 2006). *Solyc08g015750* は F-box family protein をコードしており, ユビキチン化を介した何らかの基質タンパク質の分解に関与すると考えられる. その他の遺伝子を含めて, タンパク質の機能自体が不明なものや, 雌蕊の発達及び着果への関与についての知見がないものがほとんどであった. これらの役割を知るためには個別の機能解析が必要と考えられる.

1-3-4 第1章のまとめ (図 1-10)

本研究で, *SIDELLA* を介した GA シグナルにより誘導される着果に関連した発現パターンを示す雌蕊特異的遺伝子 (*PSGs*) が単離された. 単離された遺伝子は胚珠及び胚で優先的な発現を示し, GA シグナルによっては抑制的な制御を受けていた. 機能未知の遺伝子が大半であるが, *SIINO* や *ECI* ファミリー遺伝子など胚珠の発達や受精に関わる遺伝子のホモログも含まれた. *SIDELLA* を介した GA シグナルによる制御を示唆すると同時に, *procera (pro)* 変異体や *pat-2* 変異体での採種性の低下の要因へこれらの遺伝子が関与している可能性を示唆する.

表1-1. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) のリスト

#	ITAG ID	Description in ITAG2.40
1	Solyc01g007270	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG (AHRD V1 ***-LOG_ORYSJ)
2	Solyc01g008540	Cinnamoyl CoA reductase-like protein (AHRD V1 ***-B9HNY0_POPTR); contains Interpro domain(s) IPR016040 NAD(P)-binding domain
3	Solyc01g010600	Homeobox-leucine zipper-like protein (AHRD V1 ***-Q3HRT1_PICGL); contains Interpro domain(s) IPR001356 Homeobox
4	Solyc01g0106530	Unknown Protein (AHRD V1); contains Interpro domain(s) IPR008507 Protein of unknown function DUF789
5	Solyc01g068440	Oso6g0207500 protein (Fragment) (AHRD V1 ***-Q0DDQ8_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR004253 Protein of unknown function DUF231, plant
6	Solyc01g079560	B3 domain-containing protein Os1g0197600 (AHRD V1 ***-Y1176_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR003340 Transcriptional factor B3
7	Solyc01g081360	Unknown Protein (AHRD V1)
8	Solyc01g090300	Ethylene responsive transcription factor 1b (AHRD V1 ***-C0J9I8_9ROSA); contains Interpro domain(s) IPR001471 Pathogenesis-related transcriptional factor and ERF, DNA-binding
9	Solyc01g090820	Expansin B1 (AHRD V1 ***-C8CC40_RAPSA); contains Interpro domain(s) IPR007112 Expansin 45, endoglucanase-like
10	Solyc01g095760	UDP-glucosyltransferase (AHRD V1 ***-Q8LKG3_STERE); contains Interpro domain(s) IPR002213 UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase
11	Solyc01g104390	Blue copper protein (AHRD V1 ***-B6TT37_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR003245 Plastocyanin-like
12	Solyc01g106140	F-box protein family-like (AHRD V1 ***-Q6ZCS3_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR005174 Protein of unknown function DUF295
13	Solyc01g106730	MADS box transcription factor 1 (AHRD V1 ***-D9IFM1_ONCHC); contains Interpro domain(s) IPR002100 Transcription factor, MADS-box
14	Solyc01g106980	Endo-1 4-beta-xylanase (AHRD V1 ***-B6SW51_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR013781 Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core
15	Solyc01g108380	Protease inhibitor protein (AHRD V1 ***-B3FNP9_HEVBR); contains Interpro domain(s) IPR000864 Proteinase inhibitor I13, potato inhibitor I
16	Solyc02g022860	FAD-binding domain-containing protein (AHRD V1 ***-D7MFIO_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR006094 FAD linked oxidase, N-terminal
17	Solyc02g032150	Unknown Protein (AHRD V1)
18	Solyc02g067630	Polygalacturonase 1 (AHRD V1 ***-Q22311_SOLLG); contains Interpro domain(s) IPR000408 Regulator of chromosome condensation, RCC1 IPR000743 Glycoside hydrolase, famII
19	Solyc02g069330	Unknown Protein (AHRD V1); contains Interpro domain(s) IPR006501 Pectinesterase inhibitor
20	Solyc02g072820	Subtilisin-like protease (AHRD V1 ***-Q8LWA3_SOLLG); contains Interpro domain(s) IPR015500 Peptidase S8, subtilisin-related
21	Solyc02g077170	X1 (Fragment) (AHRD V1 ***-Q7FSP8_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR005379 Region of unknown function XH
22	Solyc02g078090	Unknown Protein (AHRD V1)
23	Solyc02g079080	F-box family protein (AHRD V1 ***-B9GFH4_POPTR); contains Interpro domain(s) IPR001810 Cyclin-like F-box
24	Solyc02g084140	Unknown Protein (AHRD V1)
25	Solyc02g085190	GATA transcription factor 19 (AHRD V1 ***-B6T8S5_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR000679 Zinc finger, GATA-type
26	Solyc02g086290	Receptor serine/threonine kinase (AHRD V1 ***-Q9FF31_ARATH)
27	Solyc02g087490	Prolyl 4-hydroxylase alpha subunit-like protein (AHRD V1 ***-Q8LSI6_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR006620 Prolyl 4-hydroxylase, alpha subunit
28	Solyc02g092030	Cbs domain containing protein expressed (Fragment) (AHRD V1 ***-A6N095_ORYSI); contains Interpro domain(s) IPR002550 Protein of unknown function DUF21
29	Solyc02g093540	Cytochrome P450
30	Solyc03g020000	Penitricopeptide repeat-containing protein (AHRD V1 ***-D7L041_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR002885 Penitricopeptide repeat
31	Solyc03g025240	Multidrug resistance protein mdK (AHRD V1 ***-MDTK_YERP3); contains Interpro domain(s) IPR002528 Multi antimicrobial extrusion protein MatE
32	Solyc03g031660	Unknown Protein (AHRD V1)
33	Solyc03g058330	Unknown Protein (AHRD V1)
34	Solyc03g096190	Receptor like kinase, RLK
35	Solyc03g111190	Auxin-independent growth promoter-like protein (AHRD V1 ***-Q9FMW3_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR004348 Protein of unknown function DUF246, plant
36	Solyc03g115350	Expansin 2 (AHRD V1 ***-C0KLG9_PYPYP); contains Interpro domain(s) IPR002963 Expansin
37	Solyc03g116410	Zinc finger CCH domain-containing protein 39 (AHRD V1 ***-C3H39_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR000571 Zinc finger, CCCH-type
38	Solyc03g123770	Unknown Protein (AHRD V1)
39	Solyc03g123970	Lipid-binding serum glycoprotein family protein (AHRD V1 ***-D7LAX8_ARALY)
40	Solyc04g007310	Thaumatin-like protein (AHRD V1 ***-C1K3P2_PYPYP); contains Interpro domain(s) IPR001938 Thaumatin, pathogenesis-related
41	Solyc04g008670	Gibberellin 2-beta-dioxygenase 7 (AHRD V1 ***-B6SZM8_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR005123 Oxoglutarate and iron-dependent oxygenase
42	Solyc04g014750	TNFR/CD27/30/40/95 cysteine-rich region (AHRD V1 ***-Q2HT38_MEDTR)
43	Solyc04g025740	Homeobox-leucine zipper protein ROC3 (AHRD V1 ***-ROC3_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR001356 Homeobox
44	Solyc04g051070	Unknown Protein (AHRD V1)
45	Solyc04g058040	Laccase (AHRD V1 ***-Q9AIU3_PINTA); contains Interpro domain(s) IPR011707 Multicopper oxidase, type 3
46	Solyc04g072870	Beta-D-xylosidase (AHRD V1 ***-Q8W011_HORVU); contains Interpro domain(s) IPR001764 Glycoside hydrolase, family 3, N-terminal
47	Solyc04g074320	Zinc finger protein (AHRD V1 ***-D7KHP2_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR007087 Zinc finger, C2H2-type
48	Solyc04g074890	Unknown Protein (AHRD V1)
49	Solyc04g078240	Natural resistance associated macrophage protein (AHRD V1 ***-B3W4E1_BRAJU); contains Interpro domain(s) IPR001046 Natural resistance-associated macrophage protein
50	Solyc04g081180	Unknown Protein (AHRD V1)
51	Solyc04g082520	Ring zinc finger protein (Fragment) (AHRD V1 ***-A6MH00_LILLO); contains Interpro domain(s) IPR008166 Protein of unknown function DUF23
52	Solyc05g005240	YABBY-like transcription factor CRABS CLAW-like protein (AHRD V1 ***-Q6SRZ7_ANTMA); contains Interpro domain(s) IPR006780 YABBY protein
53	Solyc05g008320	Fascilin-like arabinogalactan protein (AHRD V1 ***-B9N201_POPTR); contains Interpro domain(s) IPR000782 FAS1 domain
54	Solyc05g010190	Unknown Protein (AHRD V1)
55	Solyc05g010200	Unknown Protein (AHRD V1)
56	Solyc05g013230	Unknown Protein (AHRD V1)
57	Solyc05g052440	Oso3g0291800 protein (Fragment) (AHRD V1 ***-Q0DSS4_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR004253 Protein of unknown function DUF231, plant
58	Solyc05g052530	Endoglucanase 1 (AHRD V1 ***-B6UJ0A_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR001701 Glycoside hydrolase, family 9
59	Solyc06g007380	Oso8g0119500 protein (Fragment) (AHRD V1 ***-Q0J8C9_ORYSJ)
60	Solyc06g048400	Unknown Protein (AHRD V1); contains Interpro domain(s) IPR008502 Protein of unknown function DUF784, Arabidopsis thaliana
61	Solyc06g060450	Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 (AHRD V1 ***-B6SSF8_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR000348 emp24/p25/p26/p24
62	Solyc06g070950	ATP-binding cassette (ABC) transporter 17 (AHRD V1 ***-Q4H493_RAT); contains Interpro domain(s) IPR003439 ABC transporter-like
63	Solyc06g073150	GDSL esterase/lipase A13g27950 (AHRD V1 ***-GDL54_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR001087 Lipase, GDSL
64	Solyc06g074160	B3 domain-containing protein Oso3g0212300 (AHRD V1 ***-Y3123_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR003340 Transcriptional factor B3
65	Solyc06g075200	Unknown Protein (AHRD V1)
66	Solyc07g007520	Unknown Protein (AHRD V1)
67	Solyc07g032700	Unknown Protein (AHRD V1)
68	Solyc07g043410	UDP-glucosyltransferase family 1 protein (AHRD V1 ***-C6K143_CITSI); contains Interpro domain(s) IPR002213 UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyltransferase
69	Solyc07g053400	Unknown Protein (AHRD V1)
70	Solyc07g054360	Unknown Protein (AHRD V1)
71	Solyc07g062320	Unknown Protein (AHRD V1)
72	Solyc07g064780	Unknown Protein (AHRD V1)
73	Solyc08g015750	F-box family protein (AHRD V1 ***-B9I6K2_POPTR); contains Interpro domain(s) IPR001810 Cyclin-like F-box
74	Solyc08g061120	Unknown Protein (AHRD V1)
75	Solyc08g068640	Protein kinase (Fragment) (AHRD V1 ***-A2Q8N5_MEDTR)
76	Solyc08g074920	Aspartic proteinase nepenthesin I (AHRD V1 ***-A9ZMF9_NEPAL); contains Interpro domain(s) IPR001461 Peptidase A1
77	Solyc08g080020	Serine protease inhibitor potato inhibitor l-type family protein (AHRD V1 ***-D7L19_ARALY); contains Interpro domain(s) IPR000864 Proteinase inhibitor I13, potato inhibitor I
78	Solyc08g082260	Integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C (AHRD V1 ***-ILKAP_RAT); contains Interpro domain(s) IPR015655 Protein phosphatase 2C
79	Solyc09g011280	Unknown Protein (AHRD V1); contains Interpro domain(s) IPR006501 Pectinesterase inhibitor
80	Solyc09g011290	Invertase inhibitor homolog (AHRD V1 ***-C49603_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR006501 Pectinesterase inhibitor
81	Solyc09g025200	Ribosomal protein L18 (AHRD V1 ***-B7FMF5_MEDTR); contains Interpro domain(s) IPR000039 Ribosomal protein L18e
82	Solyc09g042760	ZIP4/SPO22 (AHRD V1 ***-A5YI66_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR013940 Meiosis specific protein SPO22
83	Solyc09g047860	HAT1 family dimerisation domain containing protein (AHRD V1 ***-Q2R1C3_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR008906 HAT dimerisation
84	Solyc09g056030	Unknown Protein (AHRD V1)
85	Solyc09g056040	Ubiquitin-protein ligase 1 (AHRD V1 ***-Q5CHN2_CRYHO); contains Interpro domain(s) IPR005069 HECT
86	Solyc09g066050	Homeodomain-containing transcription factor FWA (AHRD V1 ***-B5BQ02_ARASU); contains Interpro domain(s) IPR002913 Lipid-binding START
87	Solyc09g073020	Unknown Protein (AHRD V1)
88	Solyc09g075110	Unknown Protein (AHRD V1)
89	Solyc09g089590	Ramosa 1 C2H2 zinc-finger transcription factor (AHRD V1 ***-DOUTY8_ZEAMM); contains Interpro domain(s) IPR007087 Zinc finger, C2H2-type
90	Solyc09g089960	Unknown Protein (AHRD V1)
91	Solyc09g091300	Self-incompatibility protein (Fragment) (AHRD V1 ***-C8C1B5_5MAGN); contains Interpro domain(s) IPR010264 Plant self-incompatibility S1
92	Solyc10g0005170	Purine permease (AHRD V1 ***-B6TETS_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR004853 Protein of unknown function DUF250
93	Solyc10g005440	Serine/threonine-protein kinase receptor (AHRD V1 ***-B6U2B7_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR002290 Serine/threonine protein kinase
94	Solyc10g017990	Cytokinin oxidase/dehydrogenase 2 (AHRD V1 ***-C0LPA7_SOLTU); contains Interpro domain(s) IPR015345 Cytokinin dehydrogenase 1, FAD and cytokinin binding
95	Solyc10g044690	Annexin (AHRD V1 ***-D2D222_GOSHI); contains Interpro domain(s) IPR009118 Annexin, type plant
96	Solyc10g047720	Unknown Protein (AHRD V1)
97	Solyc10g050750	Pectinacetyltransferase like protein (Fragment) (AHRD V1 ***-Q56WP8_ARATH); contains Interpro domain(s) IPR004963 Pectinacetyltransferase
98	Solyc10g051370	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, RLP
99	Solyc10g055600	S-phase kinase-associated protein 1A (AHRD V1 ***-B2VUU5_PYRTR); contains Interpro domain(s) IPR001232 SKP1 component
100	Solyc11g005500	ECA1 protein (AHRD V1 ***-Q5J3F8_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR010701 Protein of unknown function DUF1278
101	Solyc11g005540	ECA1 protein (AHRD V1 ***-Q5J3F8_ORYSJ); contains Interpro domain(s) IPR010701 Protein of unknown function DUF1278
102	Solyc11g006840	Unknown Protein (AHRD V1)
103	Solyc11g012650	TPD1 (AHRD V1 ***-Q6TLJ2_ARATH)
104	Solyc11g043160	Endo-1 4-beta-xylanase (AHRD V1 ***-B6SW51_MAIZE); contains Interpro domain(s) IPR013781 Glycoside hydrolase, subgroup, catalytic core
105	Solyc11g070010	F8A5.6 protein (AHRD V1 ***-Q9ZP57_ARATH)
106	Solyc11g072650	Trans-2-enoyl CoA reductase (AHRD V1 ***-C5MRG3_9ROSI); contains Interpro domain(s) IPR002085 Alcohol dehydrogenase superfamily, zinc-containing
107	Solyc12g019050	Exostosin-like (AHRD V1 ***-A4Q7M8_MEDTR); contains Interpro domain(s) IPR004263 Exostosin-like
108	Solyc12g042340	Genomic DNA chromosome 5 P1 clone MAC9 (AHRD V1 ***-Q8FLS4_ARATH)

表1-2. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) のホモログ遺伝子のリスト

#	ITAG ID	Homologue in Arabidopsis	Length (aa)	Identities (%)	Name or predicted function in Arabidopsis	
1	Soly01g007270	AT5G06300	217	56/68	82	-
2	Soly01g008540	AT5G19440	326	223/315	71	NAD(P) ₂ binding Rossmann-fold superfamily protein
3	Soly01g010600	AT1G069780	294	150/300	50	ATHB13
4	Soly01g016530	AT1G03210	314	32/69	46	Protein of unknown function (DUF789)
5	Soly01g068440	AT2G42570	367	166/341	49	TBL39 (TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 39)
6	Soly01g079560	AT3G18990	341	30/92	33	VRN1, REM39
7	Soly01g081360	-	-	-	-	-
8	Soly01g090300	AT2G44840	226	69/107	64	ATERF13, EREBP, ERF13
9	Soly01g090820	AT1G06580	273	119/249	48	ATEXPB2, EXPB2, ATHEXP BETA 1.4
10	Soly01g095760	AT5G49690	460	164/471	35	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein
11	Soly01g104390	AT1G17800	129	49/116	42	ARPN
12	Soly01g106140	AT3G25750	348	41/162	25	F-box family protein with a domain of unknown function (DUF295)
13	Soly01g106730	AT5G60440	299	95/160	59	AGL62
14	Soly01g106980	AT4G33840	576	276/545	51	Glycosyl hydrolase family 10 protein
15	Soly01g108380	AT2G38900	88	27/61	44	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
16	Soly02g022860	AT4G20820	532	243/532	46	FAD-binding Berberine family protein
17	Soly02g032150	-	-	-	-	-
18	Soly02g067630	AT2G03850	384	232/389	60	Pectin lyase-like superfamily protein
19	Soly02g069330	AT5G64620	180	26/80	33	C/VPF2, ATC/VPF2
20	Soly02g072280	AT5G67360	757	335/761	44	ARA12
21	Soly02g077170	AT1G15910	634	96/259	37	XHX domain-containing protein
22	Soly02g078090	-	-	-	-	-
23	Soly02g079080	AT5G02930	469	108/440	25	F-box/RN1-like superfamily protein
24	Soly02g084140	-	-	-	-	-
25	Soly02g085190	AT3G50870	295	127/292	43	MNP, HAN, GATA18
26	Soly02g086290	AT1G06940	332	76/267	28	protein kinase-related
27	Soly02g087490	AT3G28490	288	176/265	66	Oxoglutarate/iron-dependent oxygenase
28	Soly02g092030	AT2G14520	423	283/423	67	CBS domain-containing protein with a domain of unknown function (DUF21)
29	Soly02g093540	AT3G50660	513	193/470	41	DWF4, CYP90B1, CLM, SNP2, SAV1, PSC1
30	Soly02g092000	AT2G22410	681	181/487	37	SLO1
31	Soly03g025240	AT4G25640	514	273/398	69	DTX35
32	Soly03g031660	-	-	-	-	-
33	Soly03g056330	AT5G06760	158	57/144	40	LEA4-5
34	Soly03g096190	AT3G47570	1010	441/1003	43	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
35	Soly03g111190	AT5G63390	559	343/557	62	O-fucosyltransferase family protein
36	Soly03g115350	AT5G39280	259	146/223	65	ATEXPA23, ATEXP23, ATHEXP ALPHA 1.17
37	Soly03g116410	AT3G19360	386	54/199	27	Zinc finger (CCH-type) family protein
38	Soly03g123770	-	-	-	-	-
39	Soly03g123970	AT3G20270	722	26/51	51	lipid-binding serum glycoprotein family
40	Soly04g007310	AT4G38670	253	108/252	43	Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
41	Soly04g008670	AT4G21200	336	166/302	55	ATGA2OX8, GA2OX8
42	Soly04g014750	AT1G12064	109	34/73	47	Unknown protein
43	Soly04g025740	AT1G73360	722	52/125	42	HDG11, EDT1, ATHDG11
44	Soly04g051070	-	-	-	-	-
45	Soly04g058040	AT5G09360	569	82/212	39	LAC14
46	Soly04g072870	AT1G78080	767	445/756	59	Glycosyl hydrolase family protein
47	Soly04g074320	AT1G34790	303	143/200	72	TT1, WIP1
48	Soly04g074890	-	-	-	-	-
49	Soly04g078240	AT1G47240	530	73/95	77	NRAMP2, ATNRAMP2
50	Soly04g081180	-	-	-	-	-
51	Soly04g082520	AT4G37420	588	233/500	47	Domain of unknown function (DUF23)
52	Soly05g005240	AT1G23420	231	100/184	54	INO
53	Soly05g008320	AT5G40940	424	114/328	35	FLA20
54	Soly05g010190	AT3G42565	119	48/121	40	ECA1 gametogenesis related family protein
55	Soly05g010200	-	-	-	-	-
56	Soly05g013230	AT3G23880	364	21/57	37	F-box and associated interaction domains-containing protein
57	Soly05g052440	AT2G40320	425	279/411	68	TBL33
58	Soly05g052530	AT2G44550	490	292/476	56	ATGH610
59	Soly05g07380	AT5G01710	513	258/510	51	methyltransferases
60	Soly05g048400	AT3G30387	115	34/97	35	Protein of unknown function (DUF784)
61	Soly05g060450	AT1G21190	216	108/210	51	emp24/gp25Ljp24 family/GOLD family protein
62	Soly05g070950	AT3G47780	935	503/937	54	ATATH6, ATH6
63	Soly05g073100	AT3G27950	361	197/375	53	GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein
64	Soly05g074160	AT3G06160	374	38/131	29	AP2/B3-like transcriptional factor family protein
65	Soly05g075200	AT5G37474	80	28/83	34	Putative membrane lipoprotein
66	Soly07g007520	-	-	-	-	-
67	Soly07g032700	-	-	-	-	-
68	Soly07g043410	AT2G15480	484	166/487	34	UGT73B5
69	Soly07g053400	-	-	-	-	-
70	Soly07g054360	-	-	-	-	-
71	Soly07g062320	-	-	-	-	-
72	Soly07g064780	-	-	-	-	-
73	Soly08g015750	AT5G02920	469	58/200	31	F-box/RN1-like superfamily protein
74	Soly08g061120	-	-	-	-	-
75	Soly08g068400	AT2G25760	676	217/333	65	Protein kinase family protein
76	Soly08g074920	AT5G33340	437	206/437	47	CDR1
77	Soly08g080020	AT3G48860	85	32/86	37	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein
78	Soly08g082260	AT2G29380	362	134/298	45	HAI3
79	Soly09g011280	AT3G17220	173	31/131	24	ATPMEI2
80	Soly09g011290	AT5G64620	180	52/173	30	C/VPF2, ATC/VPF2
81	Soly09g025200	AT3G05590	187	31/50	62	RPL18
82	Soly09g042760	AT5G48390	936	527/936	56	ATZIP4
83	Soly09g047860	AT5G33406	509	52/173	30	hAT dimerisation domain-containing protein / transposase-related
84	Soly09g056030	AT4G12570	873	17/44	39	UPL5
85	Soly09g056040	AT4G12570	873	153/413	37	UPL5
86	Soly09g068050	AT1G73360	722	211/587	36	HDG11, EDT1, ATHDG11
87	Soly09g073020	-	-	-	-	-
88	Soly09g075110	-	-	-	-	-
89	Soly09g089590	AT3G23130	204	78/192	78	SUP, FON1, FLO10
90	Soly09g089960	-	-	-	-	-
91	Soly09g091300	AT3G26880	161	35/135	33	Plant self-incompatibility protein S1 family
92	Soly10g005170	AT1G30840	382	208/330	63	ATPUP4, PUP4
93	Soly10g005440	AT4G21390	849	440/858	51	B120, S-locus lectin protein kinase family protein
94	Soly10g017990	AT2G41510	575	214/525	41	ATCKX1, CKX1
95	Soly10g044690	AT5G12380	316	173/316	55	ANNAT8
96	Soly10g047720	AT5G26805	156	44/163	27	unknown protein
97	Soly10g050750	AT4G19420	397	234/381	61	Pectinacetyltransferase family protein
98	Soly10g051370	AT2G16250	915	105/198	53	Leucine-rich repeat protein kinase family protein
99	Soly10g055600	AT4G34210	152	38/47	81	ASK11, SK11
100	Soly11g005500	AT1G76750	158	63/124	51	EC1.1
101	Soly11g005540	AT2G21750	125	61/130	47	EC1.3
102	Soly11g006840	-	-	-	-	-
103	Soly11g012650	AT1G32583	179	66/112	59	TPD1-like
104	Soly11g043160	AT4G33840	576	217/545	40	Glycosyl hydrolase family 10 protein
105	Soly11g070010	AT1G06500	669	117/391	30	DRP4C
106	Soly11g072650	AT3G45770	375	215/335	64	Polyketide synthase, enoylreductase
107	Soly12g019050	AT3G42180	470	203/349	57	Exostosin family protein
108	Soly12g042340	AT5G61865	417	136/368	35	unknown protein

表1-3. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の子房での細胞種別発現パターン

ITAG ID	RPM Average										
	0 DAF Ovules	0 DAF Placenta	0 DAF Septum	0 DAF Pericarp	4 DAF Embryo	4 DAF Endosperm	4 DAF Seed Coat	4 DAF Funiculus	4 DAF Placenta	4 DAF Septum	4 DAF Pericarp
Solyc01g007270	1.9	2.4	0.9	1.1	3.2	2.6	1.0	0.6	0.4	0.9	0.5
Solyc01g008540	1.1	1.1	9.1	3.0	0.6	0.2	0.6	0.3	0.2	3.1	5.2
Solyc01g010600	1.0	0.9	6.8	12.5	1.0	0.4	0.7	0.5	0.3	1.6	2.2
Solyc01g016530	1.3	0.0	0.1	0.1	3.2	4.6	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0
Solyc01g068440	23.1	3.6	5.2	0.8	2.8	5.6	1.9	0.7	0.2	0.3	0.3
Solyc01g079560	0.3	0.2	0.1	0.1	11.4	2.1	0.4	0.3	0.0	0.2	0.1
Solyc01g081360	21.8	0.1	0.2	0.0	2.9	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1
Solyc01g090300	0.1	0.2	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.1	0.3	1.8	3.0
Solyc01g090820	4.2	0.0	0.0	0.0	10.0	2.3	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
Solyc01g095760	4.8	11.0	6.7	3.7	2.5	0.7	3.1	4.7	4.0	4.0	1.6
Solyc01g104390	47.9	0.2	1.1	0.0	252.6	124.3	3.8	2.3	9.6	0.0	0.0
Solyc01g106140	0.4	0.6	0.2	0.5	3.4	1.9	4.3	1.9	1.4	0.7	1.0
Solyc01g106730	13.9	0.8	0.3	0.1	1.0	0.4	0.9	0.2	0.1	0.0	0.0
Solyc01g106980	4.6	0.9	0.2	0.1	7.6	2.2	0.9	0.5	0.1	0.0	0.1
Solyc01g108380	0.0	0.0	0.0	0.0	638.6	239.0	4.5	3.9	17.5	0.0	0.0
Solyc02g022860	3.2	1.5	0.4	0.2	0.9	0.3	0.9	1.1	0.5	0.7	0.2
Solyc02g032150	0.2	0.0	0.1	0.0	4.2	0.4	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0
Solyc02g067630	0.0	0.0	0.0	0.0	3.5	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Solyc02g069330	17.1	0.4	0.7	0.1	0.4	1.4	0.3	0.1	0.0	0.1	0.0
Solyc02g072280	0.1	0.1	0.1	0.1	3.5	3.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0
Solyc02g077170	0.1	0.4	0.3	0.6	1.4	2.4	2.4	2.1	1.4	1.4	0.3
Solyc02g078090	21.4	0.6	0.1	0.0	1212.2	5470.1	93.8	70.7	19.2	0.1	0.1
Solyc02g079080	8.7	5.9	2.5	2.9	3.2	2.6	4.0	4.3	4.1	3.3	3.9
Solyc02g084140	0.8	0.2	0.4	0.1	2.0	1.8	0.9	0.8	0.2	0.1	0.0
Solyc02g085190	0.8	4.1	0.2	0.2	0.9	0.4	0.6	2.5	1.1	0.4	0.2
Solyc02g086290	0.8	1.4	0.8	0.1	2.5	0.9	0.9	0.3	0.3	0.3	0.1
Solyc02g087490	1.1	1.1	0.5	0.8	58.2	17.1	3.3	1.4	1.5	0.4	0.1
Solyc02g092030	0.1	0.6	0.3	0.3	0.5	0.1	0.8	4.7	6.6	0.5	1.0
Solyc02g093540	1.7	0.1	0.2	0.0	43.2	31.9	0.5	0.2	0.9	0.0	0.0
Solyc03g020000	2.2	2.1	1.5	2.2	3.6	2.5	5.0	4.9	2.8	3.3	4.0
Solyc03g025240	0.6	1.5	2.3	0.2	1.3	0.2	1.3	3.2	12.1	8.0	1.3
Solyc03g031660	0.4	0.1	0.3	0.0	2.2	2.4	9.7	2.1	0.5	0.4	0.0
Solyc03g058330	14.5	1.2	3.7	0.5	0.4	0.1	0.4	0.2	0.4	0.0	0.1
Solyc03g096190	0.8	5.6	2.6	0.8	0.4	0.3	0.7	2.4	3.7	1.3	1.1
Solyc03g111190	14.1	6.7	10.6	7.4	9.8	12.2	13.3	13.2	9.7	14.0	8.7
Solyc03g115350	0.1	0.2	0.1	0.0	10.9	7.1	0.5	0.4	0.3	0.1	0.0
Solyc03g116410	0.6	0.4	0.3	0.0	59.7	27.5	2.3	1.0	0.9	0.4	0.2
Solyc03g123770	0.7	4.5	7.2	7.0	0.2	0.5	0.2	5.1	3.5	7.1	0.9
Solyc03g123970	2.5	0.3	3.3	0.1	0.2	0.2	0.7	0.4	0.0	0.1	0.0
Solyc04g007310	7.8	0.1	0.1	0.1	125.0	36.1	2.6	0.5	1.5	0.1	0.0
Solyc04g008670	1.2	0.0	0.1	0.0	37.3	76.8	2.2	3.3	0.1	0.0	0.0
Solyc04g014750	0.3	0.0	0.2	0.0	1.8	0.4	5.0	1.7	0.2	0.0	0.0
Solyc04g025740	0.0	0.0	0.1	0.0	7.2	1.5	0.3	0.1	0.1	0.1	0.0
Solyc04g051070	6.9	8.3	8.9	1.7	4.1	8.0	4.5	2.1	0.8	1.9	0.8
Solyc04g058040	39.8	0.7	4.0	0.4	31.3	44.9	22.6	5.5	0.7	0.1	0.1
Solyc04g072870	4.0	0.0	0.2	0.0	0.2	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
Solyc04g074320	58.1	0.9	3.2	1.0	31.9	91.0	7.7	3.3	0.4	0.3	0.3
Solyc04g074890	2.7	1.0	18.7	17.2	9.0	5.3	2.5	1.6	1.6	1.0	1.0
Solyc04g078240	14.3	8.7	11.0	6.4	12.1	16.9	15.2	12.9	10.4	9.3	9.8
Solyc04g081180	0.2	0.0	0.0	0.0	2.2	0.4	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0

ITAG ID	RPM Average										
	0 DAF Ovules	0 DAF Placenta	0 DAF Septum	0 DAF Pericarp	4 DAF Embryo	4 DAF Endosperm	4 DAF Seed Coat	4 DAF Funiculus	4 DAF Placenta	4 DAF Septum	4 DAF Pericarp
Solyc04g082520	6.0	1.3	1.7	0.9	17.9	12.8	4.5	2.3	0.9	2.2	1.8
Solyc05g005240	11.9	0.7	1.6	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
Solyc05g008320	0.2	0.3	0.1	0.1	2.7	0.9	0.4	0.1	0.2	0.3	0.3
Solyc05g010190	363.3	0.3	1.3	0.1	13.9	13.9	1.9	3.1	0.2	0.0	0.5
Solyc05g010200	361.1	0.3	1.3	0.1	13.9	13.9	1.9	3.1	0.2	0.0	0.5
Solyc05g013230	1.5	0.4	2.5	0.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3
Solyc05g052440	6.7	2.4	3.3	0.3	0.4	0.4	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1
Solyc05g052530	0.6	0.5	0.2	0.0	126.6	30.1	2.6	0.2	0.5	0.0	0.1
Solyc06g007380	0.2	0.2	0.2	0.2	3.6	0.8	0.6	0.4	0.4	0.4	0.2
Solyc06g048400	102.5	0.2	0.5	0.0	3.6	0.2	0.0	0.5	0.1	0.0	0.1
Solyc06g060450	1.2	1.2	1.1	0.2	367.6	135.5	5.0	2.5	6.9	0.6	0.1
Solyc06g070950	540.0	8.5	35.3	2.6	148.8	498.3	74.4	17.1	3.2	1.0	1.2
Solyc06g073100	75.7	8.1	11.2	7.7	6.7	5.9	10.8	14.5	15.4	16.0	12.9
Solyc06g074160	5.9	7.0	8.5	9.4	1.6	2.6	3.8	4.5	3.8	2.6	1.7
Solyc06g075200	6.5	0.3	0.2	0.0	22.3	12.4	0.5	0.5	0.3	0.6	0.1
Solyc07g007520	3.1	0.5	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1
Solyc07g032700	1.0	1.5	0.6	0.1	0.6	0.2	2.7	1.6	0.1	0.4	0.2
Solyc07g043410	0.6	4.8	1.0	0.9	0.1	0.0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
Solyc07g053400	1.5	1.8	0.6	2.0	4.8	2.0	9.9	4.2	4.5	3.7	2.1
Solyc07g054360	1.2	3.9	1.9	0.2	0.4	0.9	1.2	0.5	0.2	0.5	0.3
Solyc07g062320	0.0	0.0	0.0	0.0	199.4	122.1	1.0	1.8	6.5	0.0	0.0
Solyc07g064780	42.0	5.1	0.3	0.1	1.5	0.0	0.2	0.4	0.2	0.2	0.1
Solyc08g015750	1.0	1.1	1.3	0.5	6.9	2.6	0.6	0.4	0.2	0.5	0.1
Solyc08g061120	2.4	1.0	0.4	0.2	0.8	0.3	0.5	2.6	0.3	0.5	0.4
Solyc08g066400	0.1	0.2	0.0	0.0	31.2	10.8	0.4	0.1	0.6	0.0	0.0
Solyc08g074920	4.6	0.2	0.2	0.0	0.9	0.2	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0
Solyc08g080020	0.1	0.0	0.0	0.0	781.0	162.0	7.5	3.8	7.6	0.0	0.0
Solyc08g082260	0.4	1.3	3.6	1.7	1.1	0.7	1.0	3.0	0.4	0.8	0.3
Solyc09g011280	1.0	0.3	0.1	0.0	269.7	742.9	13.8	21.2	4.1	0.0	0.0
Solyc09g011290	39.8	0.2	0.8	2.1	52.8	122.7	2.8	3.2	0.1	0.0	0.2
Solyc09g025200	0.3	0.9	0.2	0.7	1.8	1.6	2.9	2.7	2.9	2.5	0.9
Solyc09g042760	0.7	0.3	0.7	0.8	4.8	2.5	4.2	2.9	0.9	1.2	1.1
Solyc09g047860	1.9	2.5	1.8	1.2	0.5	0.5	1.8	1.0	1.3	1.2	1.0
Solyc09g056030	0.9	2.6	0.6	1.4	0.4	0.3	0.3	0.8	0.6	0.3	0.4
Solyc09g056040	1.8	2.7	2.1	2.1	2.1	2.0	5.1	6.3	4.9	3.6	4.1
Solyc09g066050	0.2	0.7	0.2	0.0	19.9	7.8	0.4	0.1	0.5	0.0	0.0
Solyc09g073020	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.7	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
Solyc09g075110	0.9	2.2	0.6	0.3	1.0	0.7	0.6	0.6	0.3	1.2	0.4
Solyc09g089590	5.2	12.8	4.3	0.1	0.5	0.3	9.3	36.6	5.5	4.9	0.0
Solyc09g089960	26.4	0.4	0.6	0.4	1742.2	1753.5	35.6	60.2	36.6	0.0	0.1
Solyc09g091300	2.5	0.1	0.1	0.0	1893.4	2574.7	184.9	68.9	4.4	0.3	0.0
Solyc10g005170	59.4	0.6	4.1	0.6	41.8	34.2	65.3	6.1	1.4	0.4	0.1
Solyc10g005440	0.1	0.2	0.1	0.1	4.9	4.0	0.3	0.2	0.1	0.0	0.1
Solyc10g017990	1.6	3.7	0.7	0.1	0.3	1.1	17.7	5.7	1.1	0.4	0.0
Solyc10g044690	23.9	0.2	1.6	0.1	1.6	0.2	0.2	0.2	0.0	0.2	0.0
Solyc10g047720	0.0	0.0	0.0	0.1	51.7	13.5	0.5	0.2	0.7	0.0	0.0
Solyc10g050750	0.2	0.4	0.1	0.0	157.2	23.5	1.4	0.3	1.4	0.2	0.0
Solyc10g051370	140.1	0.5	4.3	2.2	176.1	333.7	19.4	13.4	3.6	0.0	0.4
Solyc10g055600	0.1	0.0	0.0	0.0	3.2	1.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.0
Solyc11g005500	4.2	0.0	0.0	0.0	1.4	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.0
Solyc11g005540	10.1	0.0	0.0	0.0	4.6	2.3	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
Solyc11g006840	0.2	6.3	1.8	0.1	14.1	0.8	0.5	0.1	0.8	0.1	0.0
Solyc11g012650	249.4	0.6	17.8	2.8	158.3	86.0	82.2	5.3	5.9	0.1	0.3
Solyc11g043160	7.4	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0
Solyc11g070010	0.1	1.0	0.2	0.1	61.1	15.0	0.2	0.3	2.1	0.2	0.1
Solyc11g072650	4.3	0.3	0.2	1.4	36.0	10.8	1.3	3.2	3.0	0.2	0.0
Solyc12g019050	0.0	0.0	0.1	0.0	0.3	2.2	0.6	0.1	0.0	0.1	0.0
Solyc12g042340	0.5										

表1-4. PSGsに含まれた小タンパク質 (200aアミノ酸以下+TPD1) のリスト

ITAG ID	Description	Length (aa)	Position of secreted signal
Solyc01g016530	Unknown Protein	87	-
Solyc01g081360	Unknown Protein	151	1 - 29
Solyc01g108380	Protease inhibitor protein	77	-
Solyc02g069330	Unknown Protein	180	1 - 19
Solyc03g058330	Unknown Protein	108	-
Solyc04g081180	Unknown Protein	79	-
Solyc05g010200	Unknown Protein	115	1 - 25
Solyc06g048400	Unknown Protein	155	-
Solyc06g075200	Unknown Protein	81	1 - 22
Solyc07g062320	Unknown Protein	79	-
Solyc08g080020	Serine protease inhibitor potato inhibitor I-type family protein	104	1 - 19
Solyc09g011280	Unknown Protein	178	1 - 23
Solyc09g089590	Ramosa1 C2H2 zinc-finger transcription factor	197	-
Solyc11g005500	ECA1 protein	130	1 - 26
Solyc11g005540	ECA1 protein	136	1 - 16
Solyc11g006840	Unknown Protein	126	-
Solyc09g025200	Ribosomal protein L18	72	1 - 22
Solyc09g056030	Unknown Protein	82	-
Solyc01g007270	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG	70	-
Solyc01g079560	B3 domain-containing protein Os11g0197600	109	-
Solyc02g032150	Unknown Protein	147	-
Solyc02g084140	Unknown Protein	132	-
Solyc03g116410	Zinc finger CCCH domain-containing protein 39	117	-
Solyc04g025740	Homeobox-leucine zipper protein ROC3	148	-
Solyc04g051070	Unknown Protein	80	-
Solyc04g078240	Natural resistance associated macrophage protein	161	-
Solyc05g013230	Unknown Protein	118	-
Solyc07g054360	Unknown Protein	142	-
Solyc08g061120	Unknown Protein	190	-
Solyc09g073020	Unknown Protein	50	-
Solyc09g075110	Unknown Protein	63	-
Solyc10g047720	Unknown Protein	172	-
Solyc10g055600	S-phase kinase-associated protein 1A	51	-
Solyc01g104390	Blue copper protein	122	1 - 27
Solyc02g078090	Unknown Protein	105	1 - 26
Solyc03g123770	Unknown Protein	112	-
Solyc03g123970	Lipid-binding serum glycoprotein family protein	116	1 - 17
Solyc04g014750	TNFR/CD27/30/40/95 cysteine-rich region	105	1 - 32
Solyc05g005240	YABBY-like transcription factor CRABS CLAW-like protein	192	-
Solyc05g010190	Unknown Protein	138	1 - 23
Solyc07g032700	Unknown Protein	120	-
Solyc07g053400	Unknown Protein	97	-
Solyc09g011290	Invertase inhibitor homolog	188	1 - 24
Solyc09g091300	Self-incompatibility protein (Fragment)	148	1 - 23
Solyc11g012650	TPD1	204	1 - 28

それぞれの遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列内での分泌シグナル配列 (Secreted signal) の有無を, SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) を用いて検索した. aa, amino acid (アミノ酸).

表1-5. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の着果及びGAシグナルへの応答性

ITAG ID	RPKM value					Ratio							GA regulated	Fruit set	Pattern	Group
	D0	D4p	D4e	d0	d4e	D4p/D0	D4e/D0	d0/D0	d4e/D4e	d4e/D0	d4e/d0	d4e/D4p				
Solyc05g08320	0.02	0.51	0.07	0.07	0.58	28.13	3.72	3.98	8.69	32.33	8.12	1.15	G2			
Solyc01g090300	0.13	1.37	0.48	0.10	2.60	10.40	3.64	0.77	5.43	19.73	25.55	1.90	G1			
Solyc04g014750	0.06	1.42	0.06	0.39	0.46	23.41	0.93	6.42	8.22	7.64	1.19	0.33	G2	F1+	KEEP	Others
Solyc02g077170	0.35	2.83	0.12	0.65	1.67	8.04	0.34	1.86	13.92	4.74	2.55	0.59	G1	F2+	UP	Others
Solyc09g056040	0.34	0.87	0.22	0.41	0.53	2.54	0.63	1.19	2.43	1.54	1.30	0.61	G3	F1+	KEEP	Others
Solyc03g025240	0.54	2.71	0.03	1.84	2.40	5.00	0.05	3.40	81.86	4.43	1.30	0.89	G2	F2+	KEEP	Others
Solyc07g053400	2.20	5.66	0.54	3.50	3.99	2.57	0.25	1.59	7.33	1.81	1.14	0.71	G3	F2+	KEEP	Others
Solyc02g085190	0.85	1.18	0.19	0.72	1.00	1.39	0.22	0.84	5.37	1.18	1.40	0.84	G3	F3-	KEEP	Others
Solyc09g091300	31.92	111.98	15.71	72.19	20.10	3.51	0.49	2.26	1.28	0.63	0.28	0.18		F2+		
Solyc09g056030	0.63	1.11	0.36	0.69	0.39	1.77	0.57	1.10	1.07	0.62	0.56	0.35				
Solyc02g078090	5.22	178.90	62.22	2.31	17.36	34.29	11.92	0.44	0.28	3.33	7.51	0.10	G2			
Solyc01g079560	0.06	0.61	0.00	0.00	0.14	9.76	0.00	0.00	#DIV/0!	2.31	#DIV/0!	0.24		F2+		
Solyc03g020000	0.42	0.85	0.21	0.33	0.42	2.01	0.51	0.78	1.98	1.01	1.29	0.50		F1+		
Solyc07g062320	0.00	1.26	0.00	0.00	0.00	1.25	1.00	1.00	#DIV/0!	1.00	1.00	0.00				
Solyc03g031660	0.05	1.00	0.03	0.04	0.05	19.97	0.52	0.76	1.79	0.93	1.23	0.05		F1+		
Solyc01g108380	0.43	4.99	0.07	0.59	0.07	11.48	0.17	1.36	0.95	0.16	0.12	0.01				
Solyc08g080020	1.26	5.56	0.00	0.98	0.09	4.43	0.00	0.78	#DIV/0!	0.07	0.09	0.02				
Solyc06g060450	0.73	1.60	0.11	0.16	0.17	2.21	0.15	0.22	1.50	0.23	1.06	0.10				
Solyc05g010200	2.22	2.32	1.07	1.48	0.56	1.04	0.48	0.67	0.53	0.25	0.38	0.24				
Solyc02g067630	0.00	0.13	5.83	0.00	1.67	1.00	5.83	1.00	0.29	1.67	1.67	12.43	G3	F3+	KEEP	Others
Solyc04g007310	6.78	1.44	28.80	5.78	7.69	0.21	4.25	0.85	0.27	1.13	1.33	5.35	G3	F2-	KEEP	Others
Solyc01g008540	1.93	1.33	4.52	2.22	2.05	0.69	2.35	1.15	0.45	1.07	0.92	1.54	G3	F3+	KEEP	Others
Solyc04g082520	0.75	0.28	2.25	0.86	0.47	0.37	2.99	1.14	0.21	0.62	0.55	1.67	G3			
Solyc03g123970	0.28	0.12	1.41	0.31	0.10	0.43	5.03	1.11	0.07	0.37	0.33	0.87	G1			
Solyc01g068440	2.21	0.26	7.92	1.12	1.10	0.12	3.59	0.51	0.14	0.50	0.98	4.23	G3			
Solyc11g012650	4.79	2.94	16.46	2.26	2.22	0.61	3.44	0.47	0.14	0.46	0.98	0.76	G2			
Solyc10g005170	2.89	8.65	13.88	1.86	3.18	2.99	4.79	0.64	0.23	1.10	1.71	0.37	G3			
Solyc09g089960	20.50	49.72	43.33	15.18	4.17	2.43	2.11	0.74	0.10	0.20	0.27	0.08	G1			
Solyc09g075110	146.68	111.36	58.94	138.43	114.13	0.76	0.40	0.94	1.94	0.78	0.82	1.02		F3-		
Solyc02g087490	0.59	0.47	0.15	0.78	0.16	0.80	0.26	1.33	1.05	0.27	0.20	0.34		F3-		
Solyc03g096190	1.41	0.43	0.49	2.55	0.22	0.31	0.35	1.82	0.45	0.16	0.09	0.51	G1			
Solyc03g115350	0.21	0.00	0.00	0.62	0.02	0.00	0.00	3.04	#DIV/0!	0.10	0.03	#DIV/0!				
Solyc01g090820	2.36	0.06	0.07	2.98	0.08	0.03	0.03	1.27	1.12	0.03	0.03	1.20				
Solyc01g010600	20.12	0.00	0.98	22.12	0.02	0.00	0.05	1.10	0.02	0.00	0.00	#DIV/0!	G1			
Solyc04g074890	1.69	0.62	2.90	3.06	0.46	0.36	1.72	1.81	0.16	0.27	0.15	0.74	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc05g052440	2.87	0.08	6.17	0.95	0.54	0.03	2.15	0.33	0.09	0.19	0.56	6.84	G2	F2-	KEEP	Others
Solyc09g011280	14.81	4.47	29.24	12.33	2.07	0.30	1.97	0.83	0.07	0.14	17.33	0.46	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc06g070950	21.16	3.37	28.10	13.66	2.79	0.16	1.33	0.65	0.10	0.13	0.20	0.83	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc06g048400	18.57	0.37	29.14	6.60	2.25	0.02	1.57	0.36	0.08	0.12	0.34	6.07	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc07g007520	5.08	0.08	6.76	1.96	0.62	0.02	1.33	0.38	0.09	0.12	0.32	7.81	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc07g032700	0.88	0.39	1.23	0.42	0.05	0.44	1.41	0.48	0.04	0.05	0.11	0.12	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc06g073100	2.29	0.19	2.09	0.63	0.47	0.08	0.91	0.27	0.23	0.21	0.76	2.47	G2	F1-	KEEP	Others
Solyc11g005540	7.31	0.08	7.33	3.39	1.89	0.01	1.00	0.46	0.26	0.26	0.56	23.37	G2	F1-	KEEP	Others
Solyc02g022860	1.09	0.05	1.06	0.45	0.08	0.05	0.97	0.41	0.08	0.08	0.19	1.57	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc01g081360	23.03	0.04	15.83	8.84	1.06	0.00	0.69	0.38	0.07	0.05	0.12	29.57	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc01g106730	2.29	0.00	1.85	0.92	0.10	0.00	0.81	0.40	0.05	0.04	0.11	#DIV/0!	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc04g058040	7.20	3.12	7.37	5.33	1.53	0.43	1.02	0.74	0.21	0.21	0.29	0.49	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc03g058330	2.50	0.00	2.83	1.66	0.16	0.00	1.13	0.66	0.06	0.06	0.10	#DIV/0!	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc05g005240	86.85	0.11	77.61	50.60	1.49	0.00	0.89	0.58	0.02	0.02	0.03	12.99	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc01g095760	0.51	0.08	0.41	0.37	0.17	0.16	0.81	0.72	0.41	0.33	0.46	2.12	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc01g016530	0.90	0.13	0.41	0.42	0.10	0.14	0.45	0.47	0.25	0.12	0.25	0.82	G2			
Solyc08g074920	2.51	0.06	0.94	1.44	0.25	0.02	0.37	0.57	0.26	0.10	0.17	4.13	G1			
Solyc04g072870	1.54	0.00	0.64	0.76	0.10	0.00	0.42	0.50	0.16	0.07	0.14	#DIV/0!	G2			
Solyc10g044690	3.33	0.11	2.09	2.15	0.30	0.03	0.63	0.65	0.15	0.09	0.14	2.89	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc07g064780	4.09	0.00	2.43	2.11	0.21	0.00	0.59	0.51	0.09	0.05	0.10	#DIV/0!	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc11g043160	2.91	0.04	1.51	1.50	0.14	0.01	0.52	0.51	0.09	0.05	0.09	3.18	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc09g089590	9.44	2.95	6.46	6.97	0.83	0.31	0.68	0.74	0.13	0.09	0.12	0.28	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc09g011290	64.64	6.05	41.13	55.93	4.74	0.09	0.64	0.87	0.12	0.07	0.08	0.78	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc08g015750	1.09	0.32	0.69	0.84	0.32	0.29	0.63	0.77	0.47	0.29	0.38	1.02	G1	F1-	DOWN	Group1
Solyc04g074320	7.75	0.40	3.46	4.92	0.13	0.05	0.45	0.64	0.04	0.02	0.03	0.32	G1			
Solyc10g017990	2.02	0.16	0.91	1.62	0.09	0.08	0.45	0.81	0.10	0.04	0.05	0.55	G1			
Solyc11g005500	5.87	0.28	1.81	1.62	0.96	0.05	0.31	0.28	0.53	0.16	0.59	3.48				
Solyc01g104390	25.55	1.67	7.18	15.37	1.39	0.07	0.28	0.60	0.19	0.05	0.09	0.83	G1			
Solyc05g010190	65.04	0.16	18.58	29.90	1.49	0.00	0.29	0.46	0.08	0.02	0.05	9.33	G2			
Solyc08g082260	0.95	0.00	0.16	0.40	0.00	0.00	0.17	0.42	0.00	0.00	0.00	#DIV/0!	G2			
Solyc06g075200	11.22	0.51	1.25	5.57	0.15	0.05	0.11	0.50	0.12	0.01	0.03	0.29	G2			
Solyc02g093540	1.03	0.32	0.60	0.45	0.11	0.31	0.58	0.44	0.18	0.11	0.25	0.35	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc04g008670	1.08	0.12	0.50	0.32	0.05	0.11	0.46	0.30	0.10	0.05	0.16	0.43	G2			
Solyc11g072650	0.89	0.40	0.59	0.40	0.02	0.45	0.67	0.44	0.03	0.02	0.05	0.05	G2	F1-	DOWN	Group2
Solyc10g051370	19.17	1.74	16.78	22.41	1.36	0.09	0.88	1.17	0.08	0.07	0.06	0.78	G1	F1-	DOWN	Group2
Solyc02g069330	8.66	0.03	4.06	9.08	0.16	0.00	0.47	1.05	0.04	0.02	0.02	5.00	G1			
Solyc05g052530	2.14	0.58	0.02	1.04	0.04	0.27	0.01	0.48	1.85	0.02	0.04	0.07				

野生型および*procera*変異体 (*pro*) の着果時期子房での発現量 (RPKM value) を、各遺伝子で最大値を黄色、最小値を青として濃淡で相対量を示した。発現量を各サンプル間で比較した値 (Ratio) は2倍以上の差を赤、1/2以下の差を青で示した。ジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルによる肥大開始後に発現が制御される遺伝子群 [(d0/D0で差なし, かつd4e/D0で差あり, かつd4e/D4eで差あり (G1)], 開花時に既にGAによる制御を受け果実肥大開始後も同様の制御を受ける遺伝子群 [d0/D0で差あり, かつd4e/D0で差あり, かつd4e/D4eで差あり (G2)]; GAによって発現が維持され、着果しない場合にのみ変化するパターン [d0/D0で差なし, かつd4e/D0で差なし, かつd4e/D4eで差あり (G3)]; 着果時のみ発現が変動する遺伝子群 [D4e/D0で差なし, かつD4p/D0で差あり; 増加 (F1+) または減少 (F1-)]; 着果時に未受粉の場合と逆の変動を示す遺伝子群 [D4e/D0で差あり, かつD4p/D0で差あり, かつ逆のパターン; 増加 (F2+) または減少 (F2-)]; 着果しない場合のみ発現が変動し着果した場合には開花時での発現が維持される遺伝子群 [D4e/D0で差あり, かつD4p/D0で差なし; 未受粉で増加 (F3+) または未受粉で減少 (F3-)]; *pro* 変異体の着果時に発現が上昇する遺伝子群 (d4e/d0 > 2) をUP, 発現が低下する遺伝子群 (d4e/d0 < 0.5) をDOWN, 発現が変化しない遺伝子群 (2 > d4e/d0 > 0.5) をKEEPと表記した。各サンプルの詳細は図1-5Bを参照。

表1-6. 第1章で使用したプライマリストとRT-PCRの反応条件

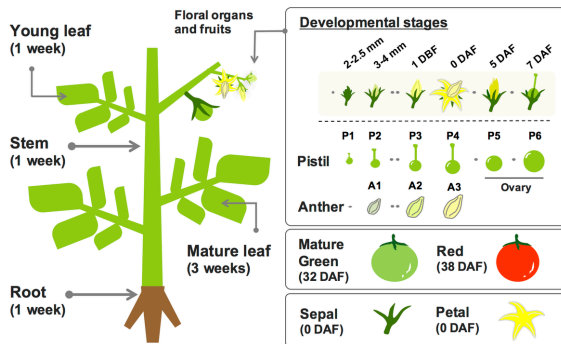
Name	ITAG ID	Description	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
SINO	Solyc05g005240	YABBY-like transcription factor CRABS CLAW-like protein	GCCACATTCACCAAGTCAAC	TTCTTGACGACGAAACCTTTGCC
SITT1	Solyc04g074320	Zinc finger protein	CTTGTGGCTTCACCCATTT	TTGCACCCCTTCTCACAAACA
SIATHB13L	Solyc01g010600	Homeobox-leucine zipper-like protein	TCCAAAATAGGAGGGCAAGA	GCCCTTTCCATTTTTTCAGT
SIECA1.1	Solyc04g071640	ECA1 protein	TGGCCGTCTATGCTAAGTTCCG	GGAGAAAGGTGTGCCACAATAACC
SIECA1.2	Solyc11g005540	ECA1 protein	GCCTTGTGTCAAGCCATTT	AGGGGCAGGACCAAAAACATAT
OPE1	Solyc06g070950	ATP-binding cassette (ABC) transporter 17	CAAGGGTGTGCTTTAAGCGAAG	TGCCTCATCCATCGAGTGTGTAG
OPE2	Solyc05g010190	Unknown Protein	TCGGACCTCAATGTTGCAAAAGC	TGGTGGCAATGAACCTTGAATGGG
OPE3	Solyc05g010200	Unknown Protein	AGGGCTGAGAGTCCGTCAGATTAC	ATACGAAGACCCCTAGCCCTCGTTG
OPE4	Solyc11g012650	TPD1	TGTGGTTTTGTTGCTTGCTCA	CTACACCATAGACAAAGTTAACACTGC
OPE5	Solyc10g051370	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase, RLP	TGCAAAAATGGCCGTGTAGC	GGAGGAAATGGCCCCCGTTAA
EPE1	Solyc09g091300	Self-incompatibility protein (Fragment)	TGCACGTCAAAGGATGACGAAAC	TGAACACAAGTGCCTGGGTGCATC
EPE2	Solyc09g089960	Unknown Protein	CCTCAATTAGCCCATTAGGTTCCG	CTGGCGCATCTACAGGTGAATC
EPE3	Solyc02g078090	Unknown Protein	TGGACATCATCATCAGCCACCCTAC	ATGGTGGCTCATCACCTGTTGG
EPE4	Solyc08g080020	Serine protease inhibitor potato inhibitor I-type family protein	TGGCCAGAGTTGATGGGAGTTG	TCATCTGGACAAAAGCCACACACG
EPE5	Solyc01g108380	Protease inhibitor protein (AHRD V1 -** B3FNP9_HEVBR)	CGCATGCAAGGTTACTGGTAAAGTC	TGGGAGAGCAACCTTTGTTGGTG
SAND	Solyc03g115810	Vacuolar fusion protein mon1	TTGCTTGGAGGAAACAGACG	GCAAAACAGAACCCCTTGAATC

PCR条件:

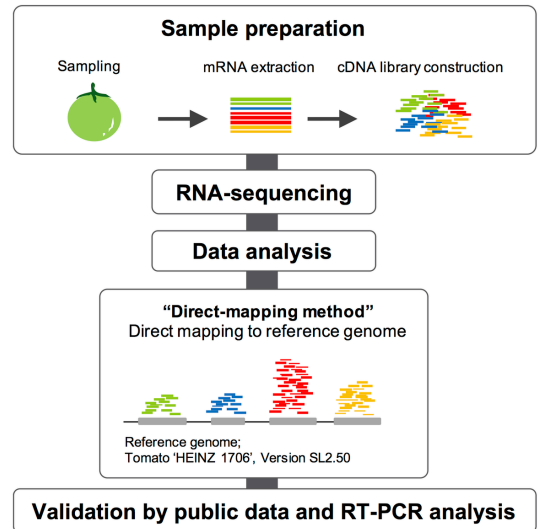
非特異的バンドが検出されるときは、アニーリング温度を変更した。

PCR mix	x 1	Temp (°C)	Time
10x Ex Taq Buffer	2.0 µl	94	3 min
2.5 mM dNTPs	1.6 µl	98	10 sec
Forward Primer (10 pmole/µl)	0.75 µl	55-60	30 sec
Reverse Primer (10 pmole/µl)	0.75 µl	72	1 min/kb
DW	13.7 µl	72	3 min
Template (gDNA or cDNA 10ng)	0.5 µl	4	-
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0.2 µl		
Total	20 µl		

A)



B)

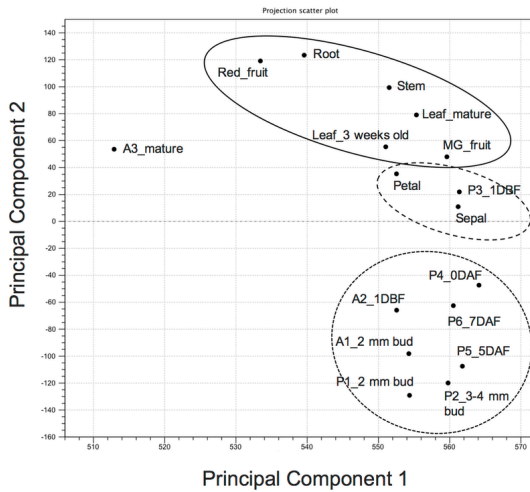


(Ezura *et al.* 2017)

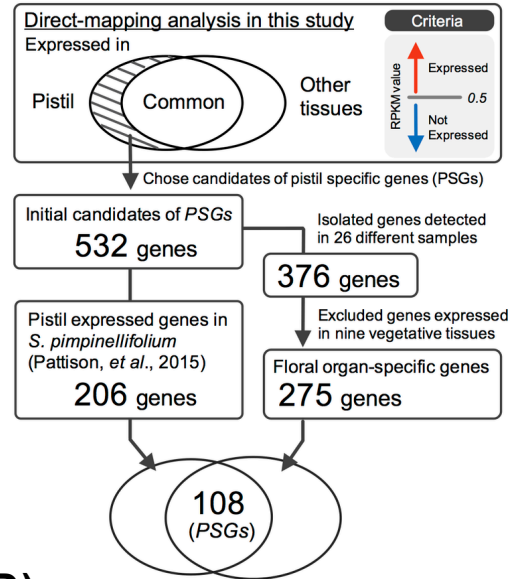
図1-1. トマトの様々な組織の網羅的遺伝子発現解析 (江面, 修士論文, 2015)

A) 解析に用いた17サンプル. 栄養器官のサンプルとして播種後3週間の本葉, 播種後1週間の子葉, 茎, 根を用いた. 一方, 13個の生殖器官サンプルとして2-2.5 mm 蕾由来の雌蕊, 3-4 mm蕾由来の雌蕊及び雄蕊, 開花1日前の雌蕊及び雄蕊, 開花日の雌蕊, 雄蕊, 花弁及び萼, 開花5日後の子房, 開花7日目の子房, 緑熟期果実, 赤熟期果実を用いた. B) RNAシーケンシングの解析手順. リードは栽培種トマト'Heinz 1706'のリファレンスゲノムに CLC Genomic Workbenchを用いてマッピングした.

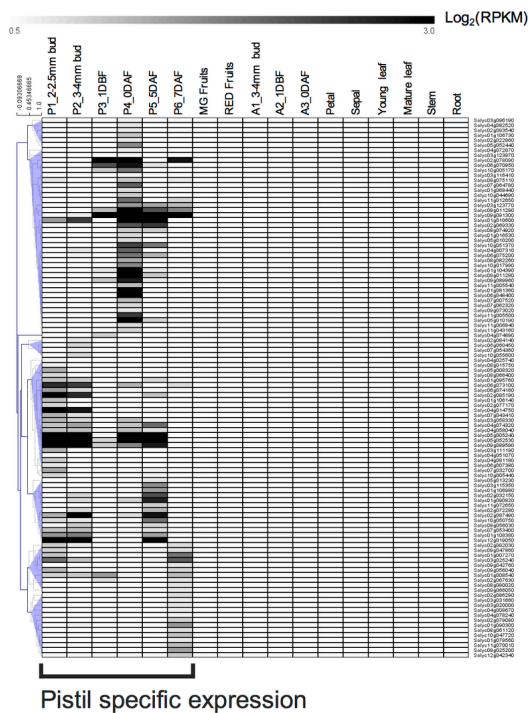
A)



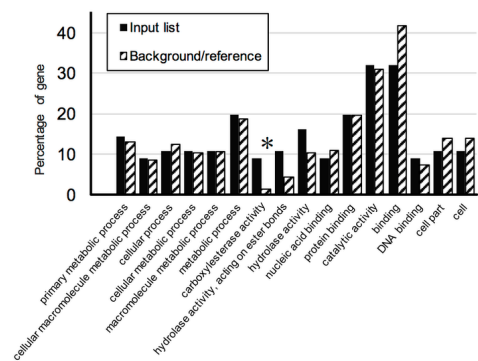
B)



C)



D)

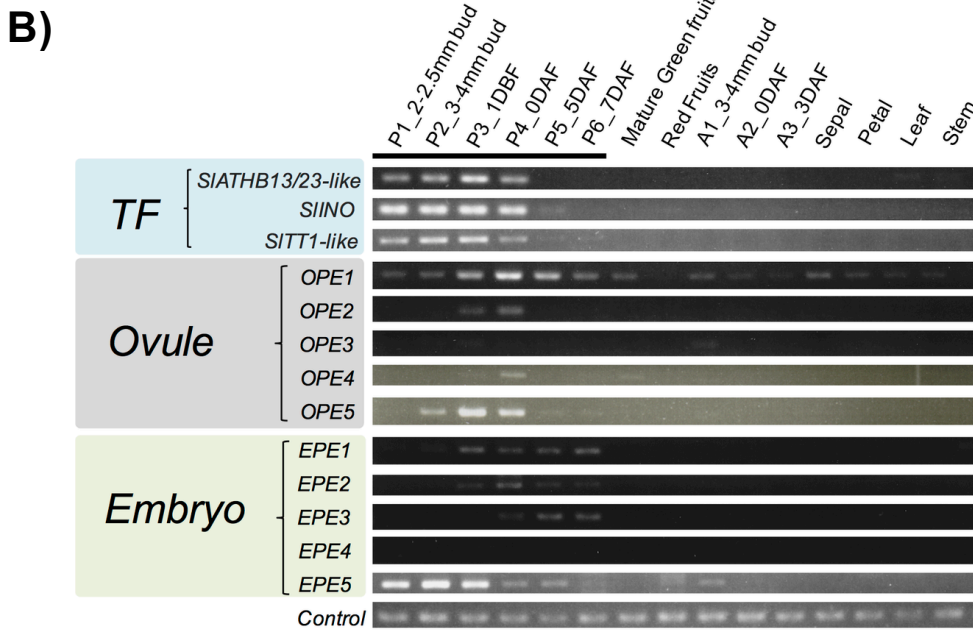
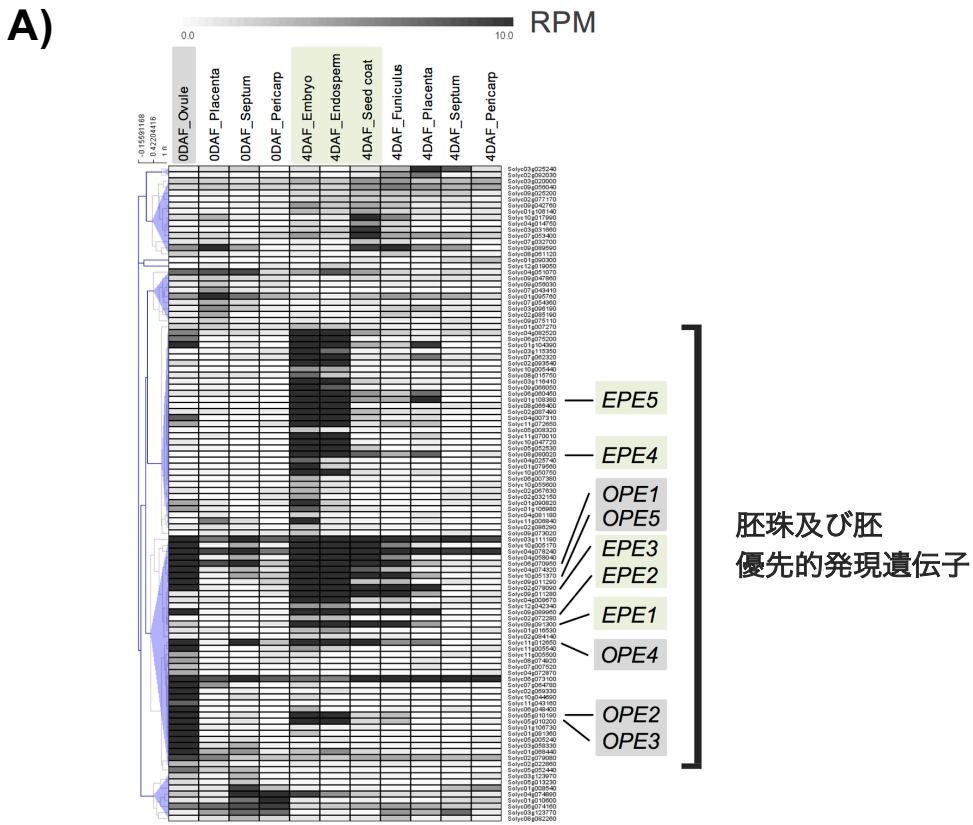


Gene ID	IPRterm
Solyc02g069330	Pectinesterase inhibitor
Solyc06g073100	Lipase, GDSL
Solyc09g011280	Pectinesterase inhibitor
Solyc09g011290	Pectinesterase inhibitor
Solyc10g050750	Pectinacylesterase

(Ezura et al. 2017)

図1-2. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子の選抜

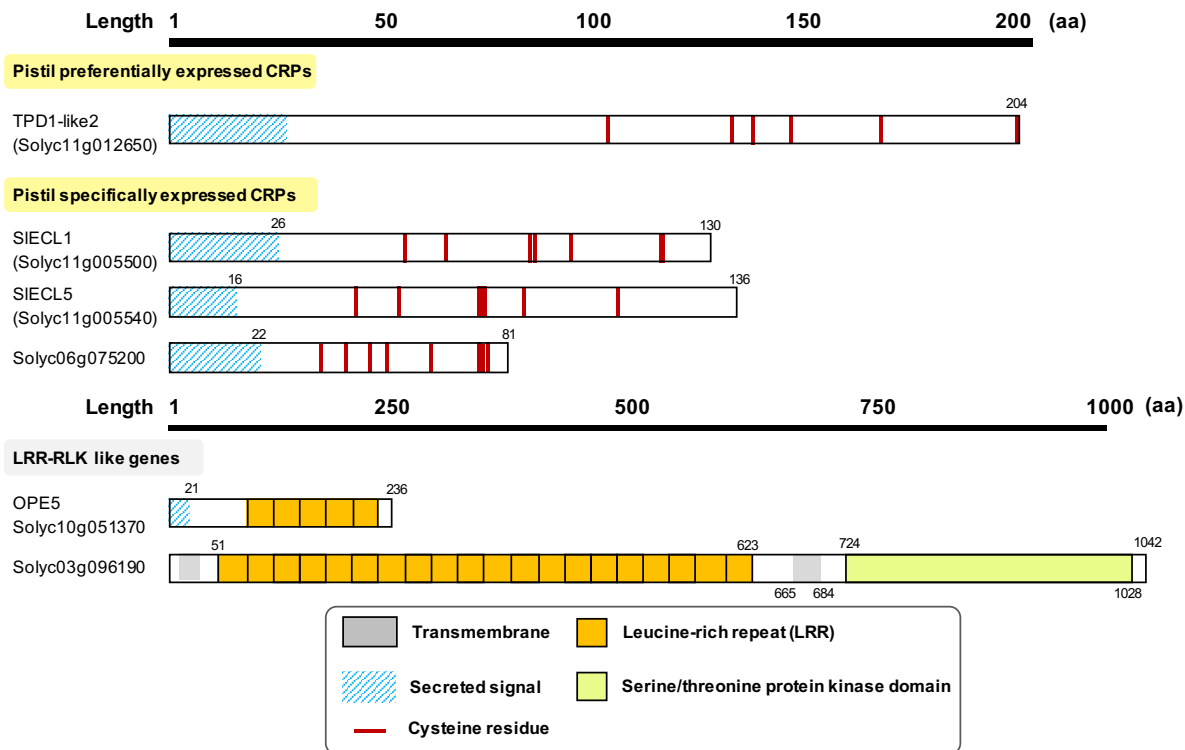
A) 17サンプルのRNAシーケンシングデータを利用したの主成分分析。雌蕊 (P), 葯 (A), 開花前 (DBF), 開花後 (DAF)。 B) 候補遺伝子の選抜とバリデーション。17サンプルの遺伝子発現データを用いて、雌蕊由来サンプルの少なくとも1つでRPKM > 0.5で、かつその他のサンプルでRPKM < 0.5の発現を示す遺伝子群を選抜した (532遺伝子)。公共データ (Pattison et al., 2015) を用いて雌蕊での発現を確認した (206遺伝子)。また、栄養器官・生殖器官を含む様々な組織の発現データで発現が確認された遺伝子群 (376遺伝子) の内、栄養器官サンプルで発現のない遺伝子群を選抜した (275遺伝子)。雌蕊での発現が確認できた遺伝子群と栄養器官での発現が見られなかった遺伝子群を比較し、共通で存在している遺伝子を雌蕊特異的遺伝子 (PSGs) として選抜した。 C) PSGsのヒートマップ。ヒートマップは、発現量をlog₂変換した数値を用いMeVで作成した。クラスタリングでは、Pearson Correlation法を用いた。雌蕊 (P), 葯 (A), 開花前 (DBF), 開花後 (DAF)。 D) Gene Ontology (GO) 解析。AgriGO (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/>) を用いてアノテーションのついている52遺伝子を解析した。Carboxylesterase activity (GO:0004091) に含まれる遺伝子が唯一優位に多く含まれた。



(Ezura et al. 2017)

図1-3. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の細胞種別の発現パターン

A) 野生種トマト (*S. pimpinellifolium*) の雌蕊での細胞種別発現パターン。多くのPSGsは胚珠もしくは種子優先的な発現を示した。ヒートマップは、公共データ (Pattison et al., 2015) から所得した発現量を \log_2 変換した数値を用いMeVで作成した。クラスタリングでは、Pearson Correlation法を用いた。OPE, ovule preferentially expressed genes (胚珠優先的発現遺伝子); EPE, embryo preferentially expressed genes (胚優先的発現遺伝子)。B) OPEs, EPEs及び3つの転写因子 (TF) [*SIATHB13/23-like* (*Solyc01g010600*), *SIINO* (*Solyc05g005240*), *SITTI* (*Solyc10g051370*)] の発現解析。RT-PCRにより発現を調査し、ほとんどの遺伝子が雌蕊特異的な発現パターンを示した。内在性コントロール遺伝子として*SAND*を用いた。雌蕊 (P), 葯 (A), 開花前 (DBF), 開花後 (DAF)。



(Ezura *et al.* 2017)

図1-4. 選ばれた雌蕊特異的なシステインリッチペプチド (CPRs) とLRR-RLK様遺伝子

TAPETUM DETERMINANT 1 (TPD1) 様遺伝子, 2つの *EGG CELL 1 (EC1)* 様遺伝子, 新規の *CYSTEINE RICH PEPTIDE (CRP)* 様遺伝子が発見された. また, レセプター様タンパク質をコードする *OVULE-PREFERENTIALLY EXPRESSED 5 (OPE5)* およびロイシンリッチリピートレセプターライクキナーゼ (LRR-RLK) 様遺伝子が発見された. 膜貫通領域 (Transmembrane) 及び分泌シグナル (Secreted signal) の位置はSignalPを用いて予測した. ロイシンリッチリピートドメイン (LRR) 及びセリン/スレオニンプロテインキナーゼドメイン (Serine/threonine protein kinase domain) はNCBI CDD CD-search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) を用いて予測した.

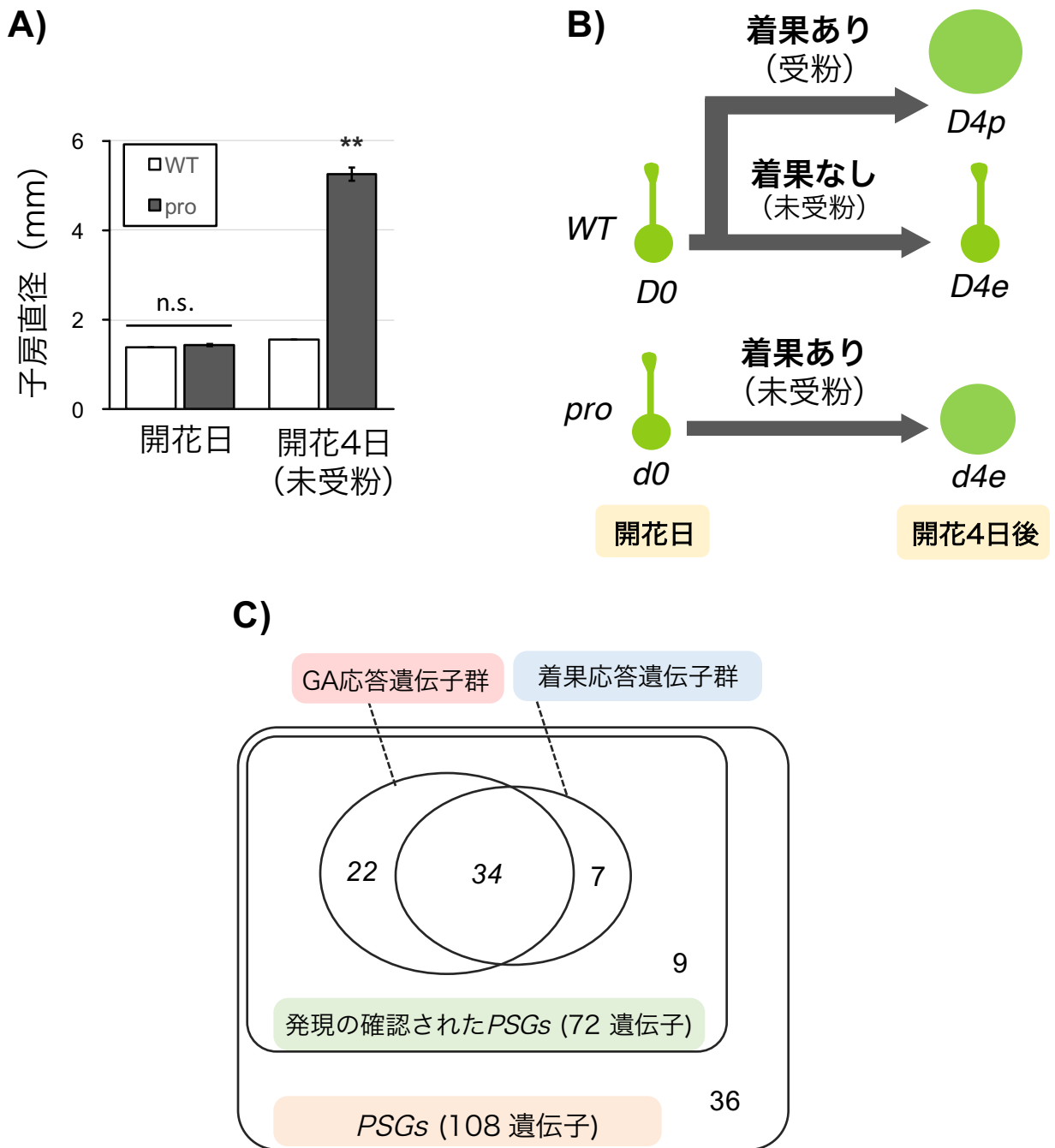


図1-5. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の開花日及び開花後4日目での発現

篠崎ら (未発表) のRNAシーケンスデータを用いてPSGsの着果時期雌蕊での発現とジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルへの応答性を解析した. A) 子房サイズ. 開花日及び開花後4日目の野生型 (WT) と *procera* 変異体 (*pro*) の子房の最大横径を計測し, *t*検定を用いて有意差の有無を調べた. ($n > 30$; *, p -value < 0.01; n.s., 有意差なし).

B) PSGsのGAシグナル応答性の解析に用いたサンプルの発達ステージ. D0, 野生型-開花日; D4p, 野生型-開花4日 (受粉あり); D4e, 野生型-開花4日 (受粉なし); d0, *pro*変異体-開花日; d4e, *pro*変異体-開花4日 (受粉なし). C) 72個のPSGsの発現パターン. 発現の確認されたPSGs [1サンプル以上で発現 (RPKM > 0.5) が確認できた遺伝子群], GA応答遺伝子 [開花日または開花4日後のサンプルで野生型と比較して *pro*変異体で発現を示した遺伝子群], 着果応答遺伝子 [野生型で未受粉時と比較して着果時に, 変動もしくは発現が維持された遺伝子群]. 各数値は遺伝子数を示す. ペアの比較で, 2倍以上もしくは1/2以下の発現差を示した遺伝子を発現が変動し遺伝子とした.

D)

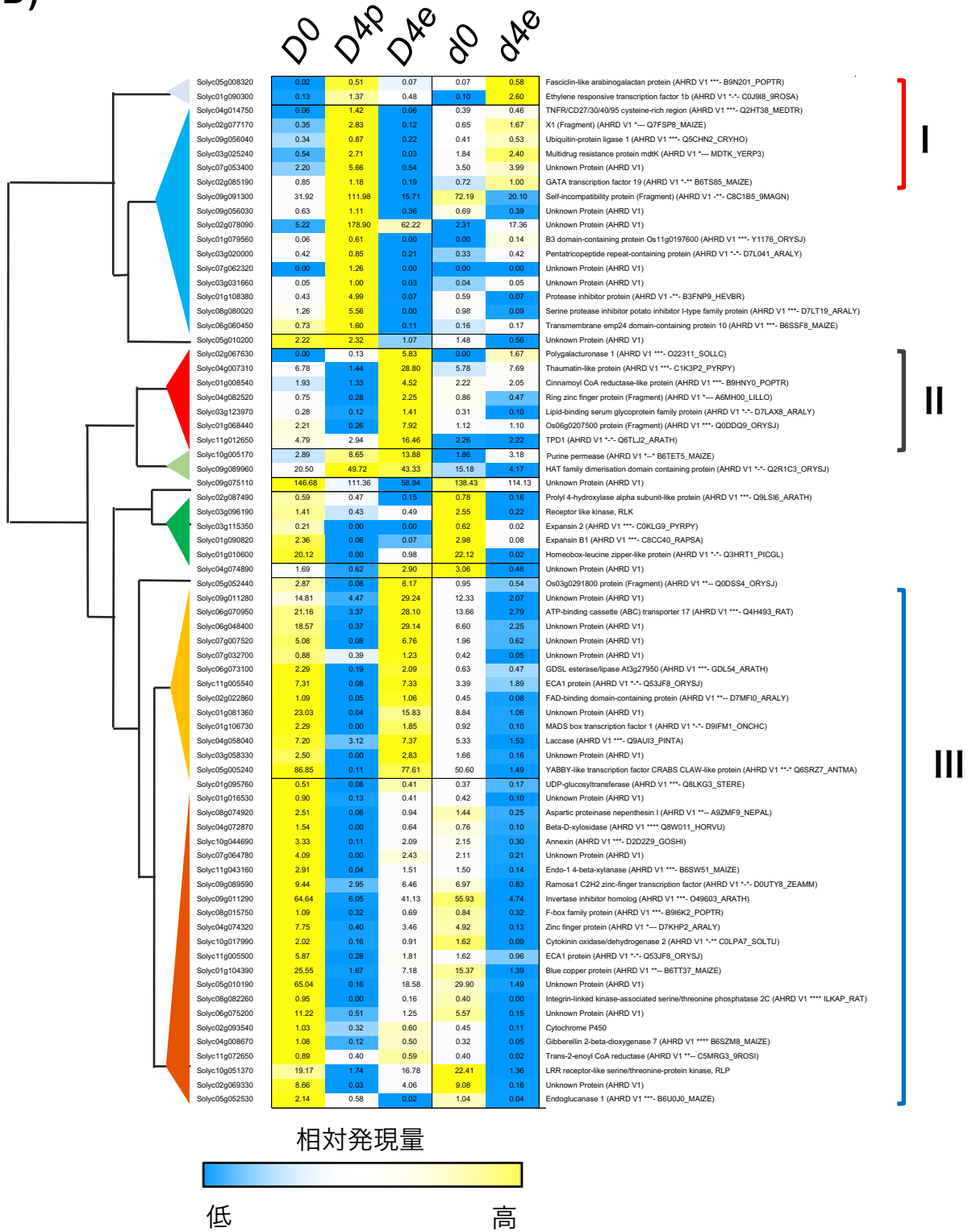


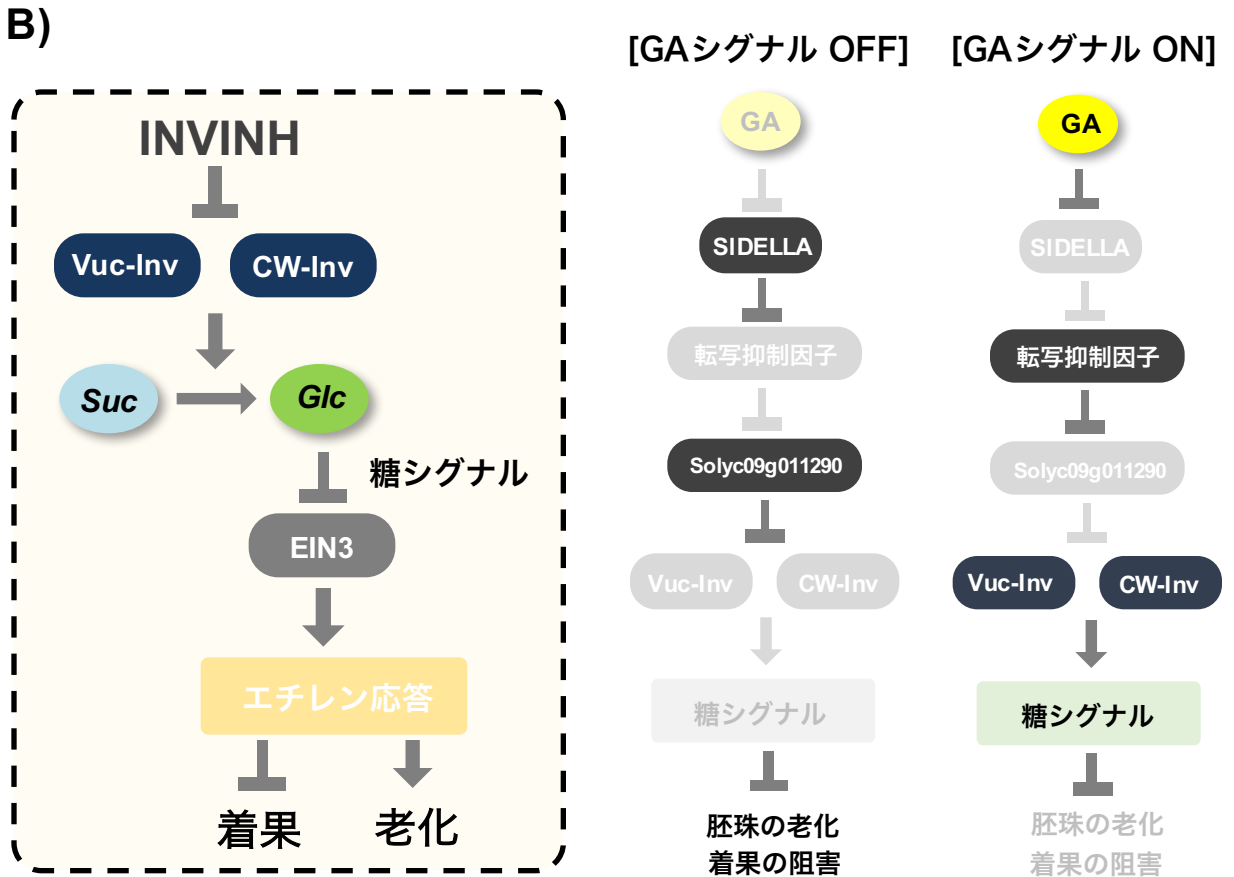
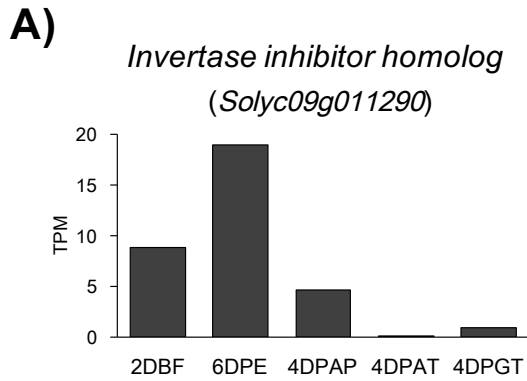
図1-5. トマトの雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) の開花日及び開花後4日目での発現 (続き)

篠崎ら (未投稿) のRNAシーケンスデータを用いて, PSGsの着果時期の子房における発現のジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルへの応答性を解析した. D) 72個のPSGsの発現パターン. 1サンプル以上で発現 (RPKM > 0.5) が確認できた遺伝子の発現パターンをヒートマップで示した. GENE-Eを用いPearson correlation法でクラスタリングした. D0, 野生型-開花日; D4p, 野生型-開花4日 (受粉あり); D4e, 野生型-開花4日 (受粉なし); d0, pro変異体-開花日; d4e, pro変異体-開花4日 (受粉なし); I, 着果・GAシグナルで発現促進; II, 着果・GAシグナルで発現維持; III, 着果・GAシグナルで発現抑制. ヒートマップは, 各遺伝子内での最大値および最小値をそれぞれ黄色および青色に設定した時の相対発現量を示す. RPKM, Reads per kilobase of exon model per million mapped reads.



図1-6. 雌蕊特異的GA応答遺伝子 (*Pistil-specific GA-responsive genes; PS-GRGs*)

着果に関連したSIDELLAを介したジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルによる制御が示唆された雌蕊特異的発現遺伝子の発現。野生型 (WT) および *procera* 変異体 (*pro*) の開花前のサンプルも含む子房RNA-seqデータでの発現。縦軸はRPKM値、横軸は子房の発達ステージを示す。DBA, days before anthesis (開花前); DAA, days after anthesis (開花後); p, 受粉あり; e, 除雄 (受粉なし)。赤枠, GAシグナルによって発現が促進された遺伝子; 青枠, GAシグナルによって発現が開花後に抑制された遺伝子。RPKM, Reads per kilobase of exon model per million mapped reads。



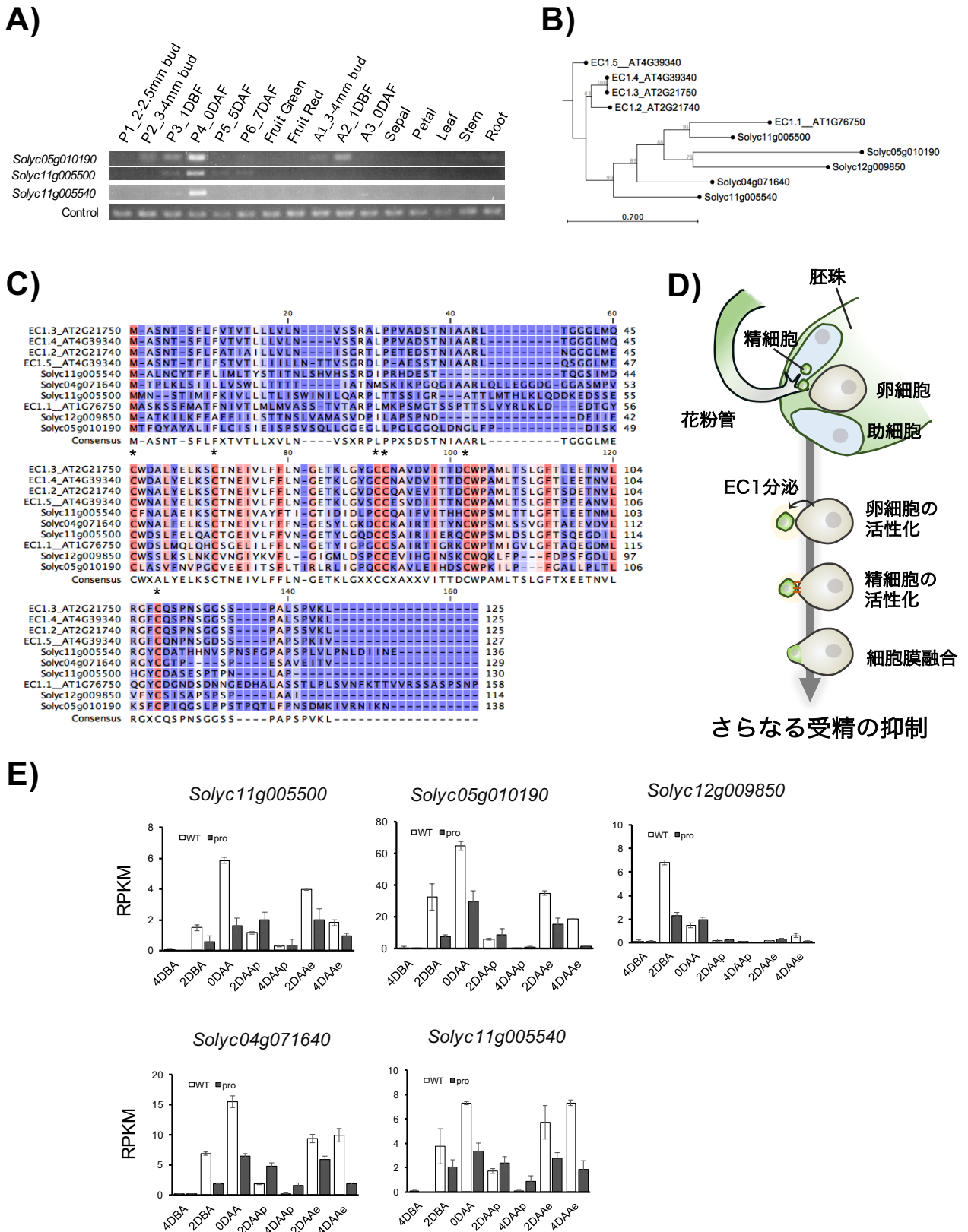


図1-8. *EGG CELL 1 (EC1)* 様遺伝子の雌蕊特異的発現遺伝子の選抜

A) 単離された*EC1*様遺伝子の組織別発現。内在性コントロール遺伝子 (Control) はSANDを用いた。*EC1*は開花時期雌蕊で特異的に発現している。雌蕊 (P), 葯 (A), 開花前 (DBF), 開花後 (DAF)。B) トマト及びシロイヌナズナの*EC1*様タンパク質の系統樹。C) トマト及びシロイヌナズナの*EC1*様タンパク質のアラインメント。アスタリスク、保存されたシステイン残基。配列の保存性が高い (赤), 保存性が低い (青)。D) *EC1*遺伝子の予想される機能。E) トマト*EC1*様遺伝子の着果時期雌蕊での発現。エラーバー = 標準誤差 (SD)。DBA, days before anthesis (開花前); DAA, days after anthesis (開花後)。RPKM, Reads per kilobase of exon model per million mapped reads。

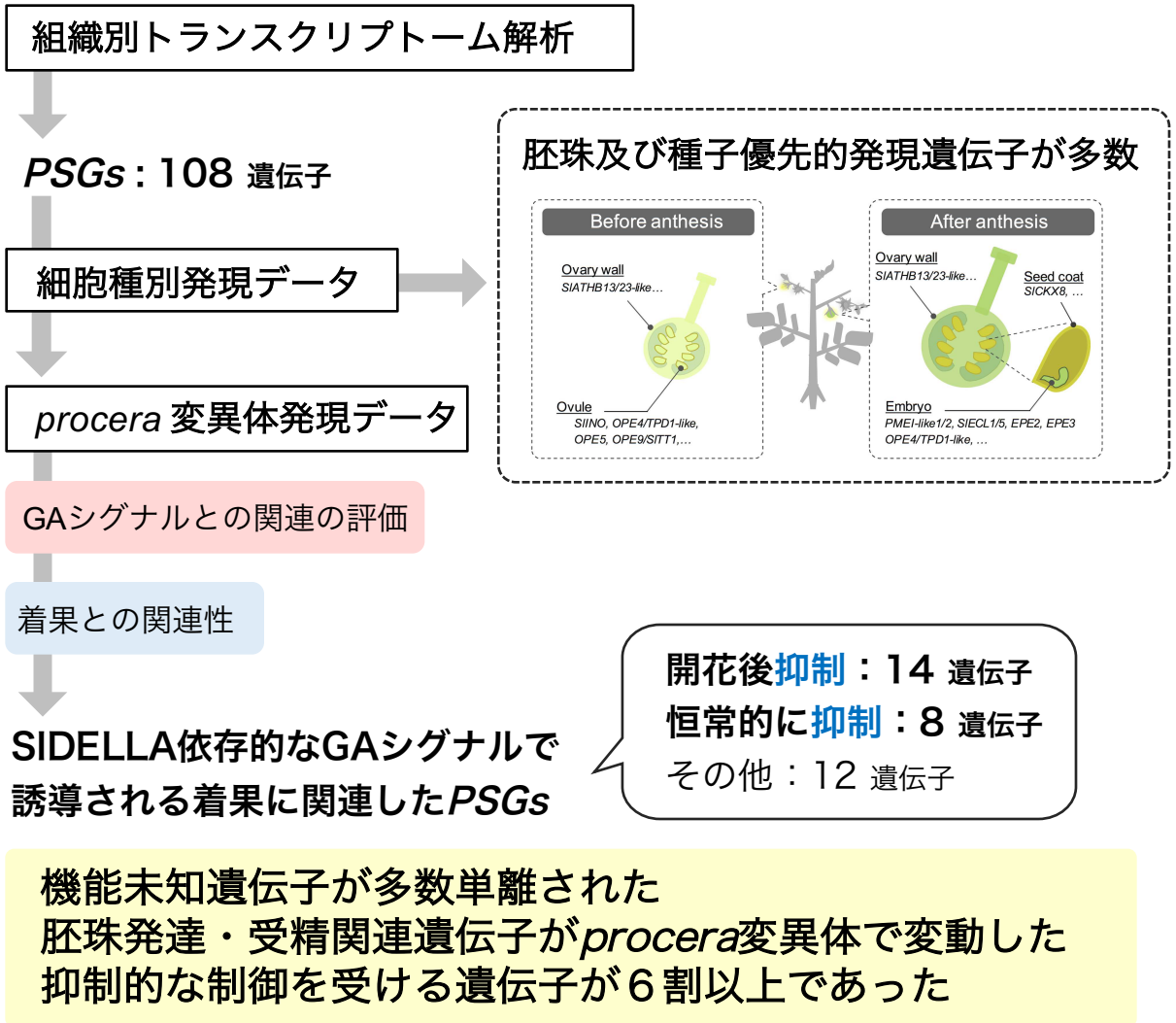


図1-10. 第1章の解析のまとめ

本研究で、着果に関連したSIDELLAを介したジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナルにより誘導される発現パターンを示す雌蕊特異的遺伝子 (PS-GRGs) が単離された。単離された遺伝子は胚珠及び胚で優先的な発現を示し、GAシグナルによっては抑制的な制御を受けていた。機能未知の遺伝子が大半であるが、胚珠の発達や受精に関わる遺伝子のホモログも含まれた。SIDELLAを介したGAシグナルによる制御を示唆すると同時に、procera 変異体や pat-2での採種性の低下の要因へこれらの遺伝子が関与している可能性を示唆する。

第2章

SIDELLA 相互作用因子候補 (CDIs)

のスクリーニング

第2章 SIDELLA 相互作用因子候補 (CDIs) のスクリーニング

2-1 緒言

第1章の研究により、修士課程時に同定した108個の雌蕊特異的発現遺伝子 (PSGs) のうち、ジベレリン (GA) シグナルによって制御される遺伝子を34個同定することができた。しかし、同定した遺伝子と GA シグナルとの関連を証明した報告が乏しく、GA シグナルの直接的な役割を解明したとは言えない。一方、前述のように、GA の生理作用は GA 依存的な DELLA の 26S プロテアソーム系を介した分解により誘導される。さらに、DELLA は標的因子 (DELLA-INTERACTING PROTEINS, DIPs) と物理的にタンパク質間相互作用することで DIPs の機能を調整することが明らかになっている (図8)。そのため、GA シグナルの下流で GA 応答を直接誘導する因子は多くの場合 DIPs と考えられる。従って、果実発達における GA シグナルの制御機構をより直接的に理解するには、DIPs を単離しその制御メカニズムを明らかにすることが重要と考えられる。現在までに報告されている DELLA と DIPs のタンパク質間相互作用の役割は以下の3種類に大分することができる。

一つ目の役割は、タンパク質修飾を担うタンパク質群との相互作用を介した、DELLA の安定性や親和性の調節である。DELLA の分解機構において、GA を受容した GID1 は DELLA と結合し、DELLA のポリユビキチン化を誘導し、ポリユビキチン化された DELLA が 26S プロテアソーム系を介した分解の標的となる (McGinnis *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Wang and Deng, 2011)。また、シロイヌナズナとイネにおいて、DELLA がリン酸化や SUMO 化されることにより DELLA の抑制活性の安定性が高まり、DELLA による GA シグナルの抑制が強まることが報告されている (Dai and Xue, 2010; Qin *et al.*, 2014; Conti *et al.*, 2014)。さらに、SECRET AGENT (SEC) や SPINDLY (SPY) といった糖修飾酵素による DELLA の修飾が、DELLA と DIPs との親和性に影響を与えることが近年明らかになってきた (Zentella *et al.*, 2016, 2017)。SEC は DELLA の O-GlcNAcylation を介して、DELLA と DIPs の親和性を低下させる (Zentella *et al.*, 2016)。一方で、SPY は DELLA の O-fucosylation を介して、DELLA と DIPs の親和性を高める (Zentella *et al.*, 2017) ことが証明されている。

二つ目の役割は、DELLA による DIPs の機能抑制である。DELLA は多くの転写因子群に含まれる DIPs と相互作用することで、それらの標的 DNA への結合を阻害することで下流の遺伝子群の発現を調節することが知られる。

三つ目の役割は、DELLA のコアクチベーターとしての役割である。コアクチベーターとは、それ自身は DNA 結合能をもたず転写因子もしくは DNA 結合因子と相互作用することで下流遺伝子の転写を調節する因子を指す。DELLA も様々な DNA 結合タンパク質と相互作用し下流の遺伝子発現を促進する役割がある。

以上のように、DIPs を同定することで DELLA の役割を明らかにすることができるとともに、DIPs が GA シグナルにおける作用機序も明らかにできると期待される。しかし、トマトにおいて SIDEELLA 結合タンパク質は単離されたとの報告はなされていない。そこで、本章では SIDEELLA が制御する果実発達における GA シグナルの役割を明らかにすることを目的として、トマト雌蕊および果実由来の cDNA ライブラリーから構築される酵母イーストツーハイブリッド (Y2H) 法を活用して SIDEELLA と直接的に結合するタンパク質群の単離を行った。

2-2 材料及び方法

2-2-1 トマト **GID1** タンパク質の単離と配列解析

酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法の手法を確認するため、まず SIDEELLA と GA 受容体 GID1 の相互作用を確認した。相互作用の解析に先立ち、シロイヌナズナの AtGID1a (At3g05120), AtGID1b (At3g63010), AtGID1c (At5g27320) のアミノ酸配列を用いて SGN (<https://solgenomics.net/>) で BLASTP サーチを行い、シロイヌナズナと相同性を示す GID1 タンパク質を同定した。アラインメント及び系統樹の作成には、Geneious 10.2.2 を用いた。

2-2-2 SIDEELLA タンパク質のオートアクチベーションの評価

Yeast two hybrid (Y2H) 法は 2 つの標的タンパク質 (X と Y) の生物内での相互作用を検証する手法である (図 2-4)。相互作用を調査したい 2 つのタンパク質をそれぞれ Bait (餌, ここでは X) および Prey (獲物, ここでは Y) と呼ぶ。またそれらの遺伝子を発現させるためのベクターをそれぞれ Bait ベクター及び Prey ベクターと呼ぶ。Bait ベクターでは標的タンパク質に酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のガラクトース代謝系活性化タンパク質である GAL4 の DNA 結合ドメイン (BD) を融合させ、Prey ベクターではもう一つの標的タンパク質に同じ GAL4 の転写活性化ドメイン (AD) を融合させる。これらのベクターを酵母に導入すると、二つのタンパク質 (X:BD, Y:AD) が相互作用

する場合に酵母に既に導入されているレポーター遺伝子 (例. 必須アミノ酸の合成酵素遺伝子) の発現を誘導する. 形質転換に用いる酵母はそのレポーター遺伝子が欠損した変異株であるため, 形質転換酵母を選抜培地 (アミノ酸欠乏培地) で培養すると, 通常は標的遺伝子が相互作用する場合のみ生育する. したがって, 酵母の生育状態から相互作用の有無を評価できる.

2-2-2-1 クローニング及び Y2H ベクターの構築

SIDELLA はイントロンを含まない遺伝子構造をしているため gDNA をテンプレートに遺伝子特異的プライマーを用いてコーディング配列 (CDS) の全長 (FL) を増幅した. 以降の PCR 反応およびクローニング反応は, 表 2-2 の条件に従い実施した. 増幅には *SIDELLA*-F1 及び *SIDELLA*-R1 のそれぞれに, エントリーベクターの両端の配列が付加された In-Fusion 用プライマー (表 2-1) を用いた. また, pCR8 ベクター (Invitrogen, USA) をテンプレートにして pCR8-F1 プライマー及び pCR8-R2 プライマーを用いて PCR を行った. 増幅産物を 1.0% アガロースで泳動し, 目的サイズの DNA 断片を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) で抽出した. 抽出した精製済みの増幅産物を, pCR8 ベクターへ導入するために In-Fusion 反応を行った. 反応液全量を用いて Competent Quick DH5α へ形質転換し, 抗生物質スペクチノマイシン (100 µg/l) を含んだ LB 培地上で培養した. 出現したコロニーに対しては, コロニーPCR によりプラスミドの導入を確認した. プラスミドの導入が確認できたコロニーを選抜して, 液体 LB 培地で 37 °C/16 時間培養後, PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA) を用いてプラスミドを抽出した. 抽出したプラスミドのインサート配列をシークエンス反応にて確認し, 正しい配列が導入されたプラスミドを次の操作に用いた. 作製したエントリーベクターを *pCR8:SIDELLA^{FL}* と名付けた.

次に, Duke 大 Tai-ping Sun 教授の研究室より分譲していただいた Bait 用デスチネーションベクター pDEST32 及び Prey 用デスチネーションベクター pDEST22 を用いて, 酵母発現用ベクターを構築した. まず, 配列を確認したエントリーベクターに含まれる *SIDELLA* の CDS 領域を, 2つのデスチネーションベクターへ導入するため LR Clonase II (Invitrogen, USA) を用いて LR 反応を行った. 反応液全量を用いて大腸菌 (Top10) を形質転換し, Bait 用ベクターを導入した細胞を LB 固形培地 (10 µg/ml ゲンタマイシン), Prey 用ベクターを導入した細胞を LB 固形培地 (100 µg/ml アンピシリン) で選抜した.

次に、コロニーPCRによりプラスミドの導入を確認した。コロニーPCRによりプラスミドの導入を確認できたコロニーからプラスミドを抽出して、*SIDELLA* の両端の配列をサンガー法により確認した。作製した酵母発現用ベクターを *pDE32:SIDELLA^{FL}* 及び *pDE22:SIDELLA^{FL}* と名付けた。また、インサートをクローニングしていないベクターをそれぞれ *pDE32:empty* および *pDE22:empty* と名付けた。

2-2-2-2 酵母の形質転換及びオートアクチベーション作用の評価

作製した酵母発現ベクターを用いて形質転換を行い、二つのベクターが導入されている細胞を選抜培地で選抜後、さらに別の選抜培地で培養しオートアクチベーションの有無を調べた (図 2-4)。具体的な手順を以下に示す。

栄養要求性酵母株 PJ69-4A を YPAD 培地へ塗布し、30°C で 2 ~ 3 日間培養した。培養が確認できたら、チップの先で菌をプレートからはがし取り、500 µl の 0.9% NaCl 溶液へ懸濁した。次に、形質転換に用いる酵母懸濁用溶液 (Yeast suspension mixture, 100 mM LiAc, 0.5 x TE in water), 酵母形質転換用溶液 (Transformation mixture, 100 mM LiAc, 40% PEG-3350, 1 x TE in water) を調製した (なお、ポリエチレングリコールは必ず指定のサイズを用いること)。次に、懸濁した酵母を最高スピード (約 13000 rpm) で 20 秒遠心して、上澄みを捨てた。菌のペレットに 2 ml 酵母懸濁用溶液を加え懸濁して、室温で 10 分以上静置した。その間に、酵母形質転換用溶液を 700 µl ずつ 1.5 ml エッペンドルフチューブに分注した。10 分以上経過したら、次の順で酵母形質転換用溶液へ各サンプルを加えた。まず、10 µl の denatured, sheared salmon sperm DNA (10 µg/µl) (Sigma, USA) を加え、次に酵母形質転換用ベクターサンプル (Bait 及び Prey) をそれぞれ 400 ng ~ 1000 ng 分加え、100 µl 酵母懸濁用溶液を加えた。全てを加えたら、転倒混和とタッピングで溶液が均一になるまでよく混ぜた。また、1.5 ml チューブを用いる場合は先端が混ざりにくいためタッピングで混ぜた。その後、30°C で 30 分間インキュベートした。続いて、細胞膜の透過性を高めるために 88 µl DMSO (Dimethyl sulfoxide, Sigma) を各チューブに加え、転倒混和とタッピングでよく混ぜた。次にヒートブロックもしくはウォーターバスを用いて、42°C で 15 分から 45 分のヒートショック反応を行った。感覚的に、30 分以上の反応で高い形質転換効率が得られた。ヒートショック反応後、15000 rpm で 10 秒間遠心して集菌し、上澄みを捨てた。ペレットを 1 ml の 1×TE バッファーで懸濁し細胞を洗い、再び 15000 rpm で 10 秒間遠心して集菌した。上澄みを捨

て、50-100 μ l 1 \times TE バッファーを加えた。最後に菌を懸濁し選抜培地 1 [SD-WL, 基本培地からトリプトファン (W) 及びロイシン (L) を抜いた培地] に塗布し 30°C で 2~3 日間培養した。Bait ベクター及び Prey ベクターにはそれぞれロイシン合成酵素遺伝子 (*LEU2*) 及びトリプトファン合成酵素遺伝子 (*TRP1*) がそれぞれコードされており、これらの酵素を元々欠損させている PJ69-4A は、2つのベクターが導入された場合でのみ SD-WL 培地上で生育できる。この原理を利用して2つのベクターが導入された細胞が選抜された。

選抜した細胞を、さらに別の選抜培地 2 [SD-WLH, 基本培地からトリプトファン (W), ロイシン (L), ヒスチジン (H) を抜いた培地] 及び選抜培地 3 [SD-WLHA, , 基本培地からトリプトファン (W), ロイシン (L), ヒスチジン (H) を抜いた培地] で培養し、生育の有無からオートアクチベーション活性の有無を判断した。

2-2-3 SIDELLA と GID1 の相互作用の評価

2-2-3-1 Yeast two hybrid 法による相互作用の検証

SIGID1s はイントロンを含む遺伝子構造をしているためトマト雌蕊由来 cDNA をテンプレートに遺伝子特異的プライマーを用いて CDS の全長 (FL) を増幅した。以降の PCR 反応およびクローニング反応は、表 2-2 の条件に従い実施した。増幅にはフォワード及びリバースプライマーそれぞれに、エントリーベクターの両端の配列がそれぞれ付加された In-Fusion 用プライマーを用いた (表 2-1)。それぞれの増幅産物を 1.0 % アガロースで泳動し、目的サイズの DNA 断片を Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) で抽出した。抽出した精製済みの増幅産物を EX-Taq HS (Takara, Japan) で反応させて 3'末端へのアデニン (dA) 付加反応を行った。その後、dA 付加済み DNA 断片を用いて TA 反応を行い、エントリーベクター pCR8 へクローニングした。反応液全量を用いて大腸菌 (Competent Quick DH5 α) を形質転換し、コロニーPCR によりプラスミドの導入を確認した。プラスミドの導入が確認できたコロニーを選抜して、37°C で 16 時間培養後、PureYield[™] Plasmid Miniprep System (Promega, USA) を用いてプラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドの配列をサンガー法により確認し、正しい配列が導入されたプラスミドを次の操作に用いた。作製したエントリーベクターを *pCR8:SIGID1b-1[^]FL*, *pCR8:SIGID1b-2[^]FL*, および *pCR8:SIGID1ac[^]FL* と名付けた。次に、Prey 用デスティネーションベクター pDEST22 用いて、酵母発現用ベクターを構築した。具体的に

は、エントリーベクターに含まれるインサート領域を、デスティネーションベクターへ導入するため LR Clonase II (Invitrogen, USA) を用いて LR 反応を行った。反応液全量を用いて Competent Quick DH5 α を形質転換し、LB 固形培地 (100 μ g/ml アンピシリン) でプラスミドが導入された細胞を選抜した。コロニーPCR によりプラスミドの導入を確認した。プラスミドの導入を確認したコロニーから、プラスミドを抽出して SIDELLA の両端の配列をサンガー法により確認した。作製した Bait 用ベクターを *pDE32:SIGID1b-1^{FL}*, *pDE32:SIGID1b-2^{FL}*, および *pDE32:SIGID1ac^{FL}* と名付けた。

また、GA シグナルが恒常的に活性化されている *procera* (*pro*) 及び *procera2* (*pro2*) にコードされる変異型 SIDELLA と GID1 との相互作用を検証するため、それらの変異体から抽出した gDNA をテンプレートに、SIDELLA クローニング用プライマーセット (表 2-1) を用いてそれぞれクローニングした (それぞれ、SIDELLA^{pro}, SIDELLA^{pro2} とする)。先述した野生型 SIDELLA のクローニングと同様の操作で、エントリーベクター及び酵母発現用ベクターの構築を行った。作製したエントリーベクターを *pCR8:SIDELLA^{pro}^{FL}*, *pCR8:SIDELLA^{pro2}^{FL}*, Prey 用ベクターを *pDE22:SIDELLA^{pro}^{FL}*, *pDE22:SIDELLA^{pro2}^{FL}* と名付けた。

次に相互作用を評価するため、相互作用を検証するための相互作用評価培地を作製した。本研究では、相互作用評価培地 1 [SD-WLH, 基本培地からトリプトファン (W), ロイシン (L), ヒスチジン (H) を抜いた培地], 相互作用評価培地 2 [SD-WLHA, 基本培地からトリプトファン (W), ロイシン (L), ヒスチジン (H), アデニン (A) を抜いた培地], および相互作用評価培地 3 [SD-WLH+3-AT, 基本培地からトリプトファン (W), ロイシン (L), ヒスチジン (H) を抜いた培地へ 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) を異なる濃度で添加したもの] を作製して評価に用いた。次に、Bait ベクター及び Prey ベクターが導入された形質転換酵母を SD-WL 培地に塗布し、30°C で 2~3 日間培養した。培養が確認できたら、チップの先で菌をプレートからはがし取り、1 ml の 0.9 % NaCl 溶液へ懸濁した。次に懸濁液を 10 倍希釈して OD₆₀₀ 値を測定した。測定した値を参考にして、OD₆₀₀ 値 = 0.25 及び 0.05 に再度希釈した。希釈した菌液を 1.2 μ l ずつ各相互作用評価培地へ滴下した。30°C で 3~4 日間培養後、細胞の生育状態を観察した。

2-2-4 cDNA ライブラリーを用いた CDIs のスクリーニング

二社に委託して Yeast two hybrid (Y2H) 法を用い、DELLA 結合タンパク質の候補

(Candidates of DELLA-interactor, CDIs) のスクリーニングを行った。SIDEELLA は DELLA ドメイン及び GRAS ドメインと呼ばれる二つの代表的な領域を有し、GRAS ドメイン内には LHRI, VHIID, LHRI, PFYRE, SAW のサブドメインが含まれる (図 4)。DELLA の全長 (1–588 aa) はオートアクチベーション活性を示すため、Bait として用いることができないため (図 2-5), 一社目 (Creative Biolabs, USA) は SIDEELLA の SAW ドメイン (496–573 aa) 及び PFYRE ドメイン (390–495 aa) を Bait として用いた。また、トマトの果実発達の初期での相互作用因子を単離することを目的にして、トマト雌蕊の cDNA ライブラリーでのスクリーニングを委託実施した (スクリーニング 1)。なお、Y2H 法には Matchmaker GAL4-based two-hybrid system (Clone-tech) が用いられ、Bait タンパク質及び Prey タンパク質はそれぞれ pGBKT7 及び pGADT7 ベクターにクローニングした。SD-Leu-Trp-His-Ade (SD-WLHA) 培地で生育し、X-gal assay で活性を示したクローンを選抜し、同様の培養を繰り返し再現性が取れたものについてシーケンスを読んだ。遺伝子の CDS が正しいフレームで挿入されているもの CDIs とした。二社目 (Hibrigenics, France) では、SIDEELLA の GRAS ドメイン (193–588 aa) を Bait として用いた。また、果実発達後期の相互作用因子の単離を目的として、こちらではトマト果実の cDNA ライブラリーを用いたスクリーニングを委託実施した (スクリーニング 2)。なお、Y2H 法には ULTImate Y2H SCREEN (Hibrigenics, France) を用いた。

2-2-5 RNA-sequence データを用いた CDIs の発現組織の調査

トマトの様々な器官の遺伝子発現データ (Tomato Genome Consortium, 2012; Ezura *et al.*, 2017) を用いて、CDIs の発現を調査した。ヒートマップは各組織での発現量 (RPKM 値) のうち最大値を 1 とした相対的な値を算出し示した。

2-2-6 SIDEELLA 全長と CDIs の相互作用の確認

2-2-6-1 クローニング及び Y2H ベクターの構築

CDI の CDS の全長もしくは部分領域を増幅して TA クローニング法もしくは In-Fusion 法を用いてエントリーベクター pCR8 へクローニングした。PCR 反応およびクローニング反応は、表 2-2 の条件に従い実施した。遺伝子特異的プライマー (表 2-1) を用いて CDS 領域を増幅した。増幅産物を 1.0% アガロースで泳動し、目的サイズの DNA 断片を Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) で抽出した。まず、SAMS1,

SAMS2, SAMS3, SAMS4, CDI1, CDI2, CDI3, CDI4, CDI5, CDI6, CDI7, CDI8, CDI10, SICNR13/CDI16 は TA クローニング法でクローニングして、2-2-3 と同様の方法で、アデニン付加反応, 並びに TA 反応を行った. また, CDI11, CDI12, CDI13, CDI14, CDI15, CDI17 は In-Fusion 法でクローニングした. CDI5 の増幅には完全長 cDNA クローン (LEFL1036CB09) をテンプレートとして用いた. なお CDI9 はクローニングすることができなかった. 2-2-2-1 と同様の方法で, pCR8 ベクターの精製済みの増幅産物を獲得し, 精製した CDIs の PCR 産物と混ぜて In-Fusion 反応を行った. 各反応液全量 5 μ l を用いて大腸菌 (Top10 もしくは Competent Quick DH5 α) (Toyobo, Japan) を形質転換して, プラスミドが導入された細胞を LB 固形培地 (100 μ g/ml スペクチノマイシン) で選抜した. TA クローニング法及び In-Fusion 法いずれの場合も, 選抜後ベクターの導入の有無を確認するため, M13 Forward プライマー及び遺伝子特異的プライマー用いてコロニーPCR を行った. 導入が確認されたコロニーを, 1 日培養してプラスミドを抽出した. 増幅が確認されたコロニーを 37°C で 16 時間培養後, PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA) を用いてプラスミド抽出を行った. 抽出したプラスミドを M13 F プライマー, M13 R プライマー及び遺伝子特異的プライマーを用いて挿入配列のシークエンスを行った. 正しい配列が確認できたエントリーベクターをそれぞれ *pCR8:SAMS1^{FL}*, *pCR8:SAMS2^{FL}*, *pCR8:SAMS3^{FL}*, *pCR8:SAMS4^{FL}*, *pCR8:CDI1^{FL}*, *pCR8:CDI2^{FL}*, *pCR8:CDI3^{FL}*, *pCR8:CDI4^{FL}*, *pCR8:CDI5^{FL}*, *pCR8:CDI6^{FL}*, *pCR8:CDI7^{FL}*, *pCR8:CDI8^{FL}*, *pCR8:CDI10^{FL}*, *pCR8:CDI11^{FL}*, *pCR8:CDI12^{FL}*, *pCR8:CDI13^{FL}*, *pCR8:CDI14^{FL}*, *pCR8:CDI15^{FL}* と名付けた.

以下 2-2-2-1 に従って酵母発現用 Bait ベクターを作製した. それぞれの遺伝子が含まれるベクターとして, *pDE32:SAMS1^{FL}*, *pDE32:SAMS2^{FL}*, *pDE32::SAMS3^{FL}*, *pDE32::SAMS4^{FL}*, *pDE32::CDI1^{FL}*, *pDE32::CDI2^{FL}*, *pDE32::CDI3^{FL}*, *pDE32::CDI4^{FL}*, *pDE32::CDI6^{FL}*, *pDE32::CDI7^{FL}*, *pDE32::CDI8^{FL}*, *pDE32::CDI10^{FL}*, *pDE32::CDI11^{FL}*, *pDE32::CDI12^{FL}*, *pDE32::CDI13^{FL}*, *pDE32::CDI14^{FL}*, *pDE32::CDI15^{FL}* と名付けた.

2-2-6-2 酵母の形質転換及び相互作用の評価

2-2-2-2 の方法に従い SIDELLA と CDI の相互作用を評価した. また, 初めに行った SAMS および SICNR13 と SIDELLA の相互作用の解析実験から, 相互作用の有無の判断の一段

階目の指標として SD-WLH 培地で十分な違いが見られるかどうかを重要と判断した。そこで、その他の候補遺伝子の実験では、CDI 全長をクローニングした Bait ベクターと *pDE22:empty* ベクターを導入した場合には SD-WLH 培地で形質転換酵母が生育せず、CDI 全長をクローニングした Bait ベクターと *pDE22:SIDEELLA^{FL}* ベクターを導入した場合に SD-WLH 培地で形質転換酵母が生育したものを“相互作用あり”と判定した。そして、“相互作用あり”となったものについてのみ、3-AT 添加培地を用いた相互作用の強度の検証実験を実施した。

2-2-6-3 タンパク質の発現の確認

ウエスタンブロッティングで Bait および Prey タンパク質が発現を確認した。SAMSs 及び SICNR13 との相互作用実験でのみ実施した。

泳動ゲルの作製

ゲル板は使用前に 70%エタノールで拭きゴミを取り除いておく。ゲル板を組み立て、15 ml チューブなどでゲルを調製した。作製したゲルを、ピペットマンを用いてゲル板に注入し、水を 1 cm 程重層した。この時、下から液が漏れていないことを確認してから、30 分以上室温で放置して、ゲルを固めた。ゲルが完全に固まった後水を捨て、水分をよくふき取り、濃縮ゲルを流し込んでコームを差し込み 20 分から 30 分放置しゲルを固めた。ゲルが固まった後にコームを静かに抜き取り、ウェルを水で洗い流した。この時ウェルに入ったゲル片などは取り除いた。ゲルはすぐ使わない場合は乾燥しないように湿らせたキムワイプ等で包み、ラップで包んで 4°C 保存した。

タンパク質の抽出

形質転換酵母から簡易的な方法を用いて、タンパク質を抽出した。まず、SD-TL 固形培地で培養した酵母を 0.9% NaCl 溶液に懸濁し、10000 rpm で 30 秒間遠心し洗浄と集菌を行った。次に DW で OD₆₀₀=10 になるよう再懸濁した液を 1 ml 作り、そこから 250 μl 分取し 10000 rpm で 30 秒間遠心し集菌した。次に 100 μl の DW で再懸濁し、0.2 N の NaOH 溶液を加えよく混ぜた後、5 分間室温で静置した。10000 rpm で 30 秒間遠心して集菌後、2x Laemmli サンプルバッファーを 50 μl 加え、5 分間 100°C 処理した。10000 rpm で 1 分間遠心し、上澄みを以降の実験に用いた (使用まで -20°C 保存)。

電気泳動

電気泳動槽にゲル板をセットして 1×Tris-glycine 泳動バッファーを満した。10×Tris-glycine 泳動バッファー (250 mM Tris pH8.3, 1.92 M glycine, 1% SDS) を直前に 10 倍希釈して使用した。ピペットでウェルを洗い、酵母の粗抽出タンパク質を 5 µl アプライした。マーカー (Precision Plus Protein Dual color standards; 10 - 250 kD) を 1.5 µl アプライした。200 V (15 mA/ゲル枚数) で 15 分, 200 V (20 mA/ゲル枚数) で約 60 分間泳動した。

ブロッティング (ウェット法)

PVDF メンブレン (Hybond P. Amersham) を必要サイズに切り (例 6×8.5 cm), 100%メタノールに 30 秒ほど浸した後, 乾燥させないように Transfer バッファー (25 mM Tris pH8.3, 192 mM glycine, 20% v/v methanol) に浸しておいた。ろ紙, メンブレン, ゲルを Transfer バッファーに 15 分ほど浸けた。ゲルとメンブレンの間に気泡が入らないように注意しながら, ゲルホルダー (+), スポンジ, ろ紙, ゲル, PVDF メンブレン, ろ紙, スポンジ, ゲルホルダー (-) の順で重ね固定した。ゲルホルダーをトランスファー装置にセットし, ホルダー内に Transfer バッファー, ホルダー外を DW で満たし, Electrode module を電極に差し込み適当な V, A で泳動した (例. 200 V/36 mA/30 min)。転写終了後のメンブレンを DW で軽くリンスした。転写効率は, ゲルを CBB 染色し確認した。

Blocking, 1 次抗体反応, 2 次抗体反応, 発色

転写後メンブレンをタッパに入れブロッキングバッファーを加えて 4°C で一晩静置してブロッキングを行った。バッファーは 1 x PBS (0.1% Tween20), Blocking 剤はスキムミルクを 5%濃度で用いた。メンブレンをトレーに入れ, 5%ブロッキング溶液 5 ml + 1 次抗体 5 µl (1:3000 希釈の場合) を加えて, 室温で 1 時間振とうした。DW で 2 度すすいだ後に, 1 x PBS (0.1% Tween20) でさらに 10 分×3 回洗浄した。その後, メンブレンを別のトレーに入れ, 5%ブロッキング溶液 5 ml + 2 次抗体 0.5 µl (1:10000 希釈の場合) を加えて, 室温で 1 時間振とうした。DW で 2 度すすいだ後に, 1 x PBS (0.1% Tween20) でさらに 10 分×3 回洗浄した。最後に, SuperSignal West Dura もしくは SuperSignal West Pico (Thermo Fisher, USA) を用いてシグナルを検出した。使用する検出試薬の説明書に従って操作した。Stable Peroxide Solution 及び Luminol/Enhancer Solution を等量ずつラ

ップの上で混合し、メンブレンから余計な水分を取り除き、反応液を裏表に何度かつけた。室温で5分間静置した後、余分な反応液を取り除き、メンブレンを新しいラップに包み、暗室でX線フィルムに感光させ現像した。

2-3 結果及び小考察

2-3-1 SIDELLA と GID1 の相互作用の評価

トマトの DELLA 分解機構の理解を深めること、また、タンパク質相互作用を検証する実験手法を習得することを目的に SIDELLA と GA 受容体タンパク質 GIBBERELIN INSENSITIVE DWARF1 (GID1) の GA 存在下及び非存在下での両者の物理的相互作用を検証した。

まず、トマトの GID1 ファミリーの遺伝子を検索したところ、3 遺伝子のみがヒットした。GID1 ファミリーは双子葉類では GID1b タイプ及び GID1ac タイプに分類され、先行研究で報告されている通りトマトは 2 つの GID1b タイプメンバー [*SIGID1b-1* (*Solyc09g074270*), *SIGID1b-2* (*Solyc06g008870*)] と 1 つの GID1ac タイプメンバー [*SIGID1ac* (*Solyc01g098390*)] を有していた (Voegelé *et al.*, 2011; 図 2-1)。また、アミノ酸配列の解析から、それぞれのメンバーは GID1 ファミリーが含まれるホルモン感受性リパーゼに特徴的なモチーフ (Østerlund, 2001) や、結晶構造解析によって明らかにされた GA や DELLA との結合に必要なアミノ酸を全て有していた (Murase *et al.*, 2008; Shimada *et al.*, 2008)。これは 3 つ全てが GA 受容体として機能を有していることを示唆する (図 2-2)。次に、どの GID1 オーソログが GA シグナル伝達において中心的な役割を担っているかを推定するため、トマトの様々な組織のトランスクリプトームデータを用いて発現レベルとパターンを調査した。その結果、*SIGID1b-1* と *SIGID1b-2* は雌蕊や果実を含めて様々な組織で *SIGID1ac* よりも高いレベルで発現していることが示された (公共データ [Tomato Genome Consortium, 2012; Zhang *et al.*, 2017; Ezura *et al.*, 2017], 図 2-3)。

配列解析から 3 つの GID1 が GA 受容体としての機能を有していることが示唆されたため、これらをクローニングして SIDELLA との相互作用を調査した。相互作用の評価には Yeast two hybrid (Y2H) 法を用いることにした (図 2-4)。

Y2H 法は、2 つの標的タンパク質の生物内での相互作用を検証する手法である。Y2H では、酵母の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (BD) または転写活性化ドメイン (AD) を融合させた 2 つの調査対象タンパク質を酵母で発現させる。対象タンパ

ク質が相互作用する場合には、GAL4 標的配列に繋がれたレポーター遺伝子 (例. 必須アミノ酸の合成酵素遺伝子) の発現を誘導し、一部の必須アミノ酸を除いた選抜培地で生育する。したがって、酵母の生育状態から相互作用の有無を評価できる。しかし、転写因子へ BD を融合すると、相互作用の有無にかかわらずレポーター遺伝子の発現を誘導してしまうことがある。これを、オートアクチベーション活性と言う。DELLA タンパク質はこのオートアクチベーション活性を示すことが報告されており (de Lucas *et al.*, 2008), Y2H 解析を行うにあたりトマトの SIDELLA がオートアクチベーション活性を有するかを確認した。SIDELLA の全長をサブクローニングして Bait ベクターに導入し、空の Prey ベクターとともに酵母に形質転換したところ、選抜培地でも生育が確認された (図 2-5, プレート上部)。一方で、SIDELLA を Prey として空の Bait ベクターとともに酵母へ形質転換したところ、生育が見られなかった (図 2-5, プレート下部)。そこで、本研究では SIDELLA を Prey として用いることにした。なお、DELLA タンパク質に酵母の転写抑制ドメインを融合して Bait として用いる方法も提案されている (Fukazawa *et al.*, 2014)。

SIGID1b-1, *SIGID1b-2*, *SIGID1ac* の全長を Bait ベクターにクローニングして、GA 非存在下および GA 存在下で SIDELLA との相互作用を検証した。GID1 には DELLA と GA 依存的に相互作用 (以下 GA 依存結合と呼称) するメンバーと、GA 非依存的な相互作用 (以下 GA 非依存結合と呼称) が可能なメンバーが存在し、いずれも GA 存在下でより強く DELLA と結合することが知られている。これは、GA 受容に伴う C 末端部分 (Lid) の立体構造変化もしくは Lid の可動性の低下によると考えられている (Murase *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2013)。SIDELLA と SIGID1s の相互作用実験の結果、SIGID1ac は GA の有無にかかわらず DELLA と強く相互作用した (図 2-7B)。一方で、GID1b タイプ (SIGID1b-1 と SIGID1b-2) は GA 非存在下では DELLA と弱く結合し、GA 添加でその相互作用は強まった (図 2-7B)。シロイヌナズナ、ナタネ、ダイズなどでは GIDb タイプのメンバーが GA 非依存結合を示すが、GID1ac タイプのメンバーは示さない (Griffiths *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2006)。また、Yamamoto ら (2010) は AtGID1b のループ領域 (図 2-1A) を AtGID1a もしくは AtGID1c の対応する配列と入れ替えると、GA 依存的な結合能には影響を与えずに GA 非依存的な結合能が失われることを報告している。また、ダイズやナタネの GA 非依存的な結合能を示すメンバー (GmGID1b-2, GmGID1b-3, BrGID1b-3) でも、GID1ac タイプのメンバーとループ領域を入れ替えると GA 非依

存的な結合能が失われることが知られる。以上の結果から、GID1 のループ領域の配列が GA 依存的・非依存的な DELLA との結合を決定すると考えられている。一方、本研究の結果は GID1ac タイプの SIGID1ac が SIDELLA との強い GA 非依存的な結合を示した点でこれまでの報告とは異なる。SIGID1 のループ領域の配列を比較すると種間での保存性が極めて低く、配列の保存性と特性の関連性は見出されなかった (図 2-1B)。DELLA と受容体 GID1 との物理的相互作用は DELLA の抑制活性を弱めることが示唆されている (Ariizumi *et al.*, 2008) が、先に示したように、SIGID1ac の発現は GID1b タイプ (SIGID1b-1, SIGID1b-2) と比べて 1/2.5~1/43.6 と低いため、GID1ac の果実発達時における GA シグナルへの効果は小さいかもしれない。今後 SIGID1ac のループ領域と GID1b タイプのメンバーのループ領域を入れ替えた相互作用実験を行うことで特性の違いの要因を追求できる可能性がある。

次に、GID1 と DELLA の相互作用を確認できる実験系を確立できたため、変異型の SIDELLA タンパク質 (SIDELLA^{pro} および SIDELLA^{pro2}) と SIGID1s の相互作用を評価した。GA シグナルの研究材料として盛んに利用されてきた *procera* (*pro*) は、VHIID ドメインに変異を持ち DELLA 相互作用因子 (DIPs) との相互作用が弱まることで GA シグナルが亢進していると考えられている (Jones *et al.*, 1987; Bassel *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2012; Levine *et al.*, 2015)。また、*procera2* (*pro2*) は本研究室で新たに単離されたアレルで、SAW ドメインの変異によって GA シグナルが亢進されている。*pro2* 変異体は *pro* 変異体よりも茎の伸長が低いため、GA シグナルに対する影響は *pro* 変異に比べて *pro2* 変異の方が弱いと考えられている (図 2-6)。GA シグナルを更新させる要因として GID1 と SIDELLA が相互作用した複合体として存在することで、SIDELLA の抑制活性が弱められる可能性も考えられる (Ariizumi *et al.*, 2008)。また、*pro* および *pro2* 変異の生じている GRAS ドメインと GID1 との相互作用に対する役割はほとんど明らかになっていない (Hirano *et al.*, 2010)。その点を検証するため、変異型の SIDELLA タンパク質 (SIDELLA^{pro} および SIDELLA^{pro2}) と SIGID1s の相互作用を評価した。その結果、SIDELLA^{WT} に比べて SIDELLA^{pro2} は、GA 存在下および非存在下いずれの条件においても GID1b タイプと弱い相互作用を示した一方、SIGID1ac との相互作用には違いが見られなかった (図 2-3C)。一方で、SIDELLA^{pro} とどの SIGID1 を同時に発現させても細胞の生育は確認されず、相互作用が大きく低下していると考えられた。

これまでの研究から DELLA の SAW ドメインは DELLA の抑制活性に重要なことが示唆されている。例えば、イネの SLR1 は SAW ドメインの一部の欠損 [*slr1-3* (W609stop), *slr1-4* (W620stop)] や点変異 [*slr1-7* (T617P)] などにより DELLA の抑制活性が低下する (Hirano *et al.*, 2012)。これは、SAW ドメインが GAF1 や ARR2 などの標的因子との相互作用にも重要であることに起因すると考えられる (Fukazawa *et al.*, 2014; Marín-de la Rosa *et al.*, 2015)。これらの転写因子との相互作用では DELLA がコアアクチベーターとして働くタイプ 2 機構により、GA 応答の抑制因子 (GA と拮抗するシグナル) の発現を促進すると示唆されている。その一方で、SLR1 の SAW ドメイン内の G576V 変異により、DELLA の抑制活性には影響を与えず OsGID1 との相互作用を低下することも報告されている (Hirano *et al.*, 2010)。また、トマトの *pro2* 変異の 2 アミノ酸上流で 565 番目のアルギニン (R) に相当する R621A 置換は OsGID1 と SLR1 の相互作用に影響を与えないという結果も報告されている (Hirano *et al.*, 2010)。今回の結果から、SAW ドメインが SIGID1 と DELLA の相互作用にも関わるという仮説を支持され、同時に *pro2* 変異が生じたアミノ酸が SIDELLA-GID1 の相互作用と DELLA の抑制活性の両方に重要であることが明らかになった。以上を踏まえると、*pro2* 変異体の表現型は SIDELLA と SIGID1 の GA 非依存的な相互作用が強まったためではなく、DIPs との相互作用の低下によると示唆された。以上、ここで試した手法は SIDELLA を用いたタンパク質相互作用の検出実験に利用できることを確認した。

2-3-2 cDNA ライブラリーを用いた CDIs のスクリーニング

スクリーニング 1 の結果、6 個の PFYRE ドメイン相互作用因子と 14 個の SAW ドメイン相互作用因子が選抜された (表 2-4, 図 2-9)。スクリーニング 2 の結果、GRAS ドメインと相互作用する因子として 37 個の遺伝子が選抜された (表 2-4, 図 2-9)。そのうち、7 個の遺伝子が高いレベルの信頼性 (A 及び B) を示した。

2-3-3 CDIs と SIDELLA の相互作用

スクリーニング 1 及びスクリーニング 2 で選抜された候補遺伝子のうち、スクリーニングの信頼度をスコアが高い遺伝子、発現パターンやアノテーションから相互作用が期待できるものを選び SIDELLA の相互作用の確認を実施した (表 2-5)。

2-3-3-1 スクリーニング 1 の選抜候補と SIDELLA の相互作用の検証

SAMS4 と CNR13 に着目して相互作用の確認実験を実施した。以下に詳細を述べる。

SAMS と SIDELLA の相互作用の検証

S-adenosylmethionine synthase (SAMS) はエチレンおよびポリアミン (PAs) の前駆体となる S-adenosyl methionine (SAM) の合成を担う酵素遺伝子である。トマトのゲノム中には 4 つの SAMS が存在する (SAMS1- SAMS4)。SAM は DNA などのメチル化の基質として利用され、DNA のメチル化は大規模な遺伝子の発現調節などへ深くかかわる。メチル化と果実形成の関係を示唆する報告はきわめて少ない。しかし、DNA のメチル化は胚発生には重要な役割を持つことが知られおり、シロイヌナズナのメチル基転移酵素の変異体は胚発生に異常が生じる (Xiao *et al.*, 2006)。SIDELLA と SAMS の相互作用は、エチレン生合成への関与と同時に GA によるメチル化制御の可能性を示唆した。そこで、SAMS ファミリーと SIDELLA の相互作用を検証した。

SAMS1, SAMS2, SAMS3, および SAMS4 を Bait に、SIDELLA を Prey にして Y2H 実験を行ったところ、トリプトファン・ロイシン・ヒスチジン除去培地で形質転換体を培養したところ生育が確認されず、相互作用を支持する結果は得られなかった (図 2-10)。また形質転換体をトリプトファン・ロイシン除去培地で培養した場合は生育が確認されたもののコロニーの色が赤くなった。つまり形質転換体では ADE2 遺伝子の発現が誘導されていないこと示唆された。スクリーニング 1 に用いたのは SAW ドメイン (79 アミノ酸) のみであったため、SAW ドメインの相互作用因子の偽陽性として SAMS が選抜されてきたことも考えられる。あるいは、相互作用の確認に用いたベクターの種類の違いも影響しているかもしれない (スクリーニング; Match-maker, 確認実験; ProQuest.)。Match-maker system に用いられるベクターは、検出感度は高いが偽陽性も多いことがいくつかの論文で報告されている (Rajagopala *et al.*, 2009; Caufield *et al.*, 2012)。

一方、C 末端欠損させた SIDELLA の GRAS ドメイン部分 (SIDELLA-GRAS) を Bait に、SAMS1-SAMS4 を Prey に Y2H 実験を行ったところ、相互作用の可能性を示唆する結果が得られた (図 2-11)。SIDELLA-GRAS は単独で導入した場合でもレポーター遺伝子の発現を弱く誘導するオートアクチベーションを示す (図 2-11)。形質転換体をトリプトファン・ロイシン・ヒスチジン除去培地で培養したところ、タンパク質の強い発現が確認された SAMS3 及び SAMS4 の形質転換体では SIDELLA-GRAS による生育促進

の抑制が見られた。しかし、形質転換体をトリプトファン・ロイシン除去培地で培養した場合は、他の形質転換体との生育差は確認されなかった。つまり、トリプトファン・ロイシン・ヒスチジン除去培地での生育抑制は、SAMS3 及び SAMS4 が過剰に発現したことによる直接の影響ではなく、SIDEELLA-GRAS のオートアクチベーション活性による *HIS3* 遺伝子の発現誘導を SAMS が物理的に相互作用することで阻害したためであると考えられる。

ヒト SAMS のアイソフォームの一つである METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE 2A (MAT2A) は、核内で DNA 結合タンパク質・ヒストンメチル基転移酵素と結合することで特定の領域の遺伝子発現を抑制する複合体を形成することが報告されている (Katoh *et al.*, 2011; Kera *et al.*, 2013) (図 2-12A)。植物ではこれに関連した研究の報告はされていない。しかし、この報告と今回の実験結果を考慮すると、トマト SAMSs へ DNA 結合ドメインを融合した場合 (SAMSs を Bait にした相互作用確認実験；図 2-10)、SIDEELLA-GRAS のオートアクチベーションが抑制された場合 (SAMS を Prey にした実験；図 2-11) のいずれでも SAMSs によるレポーター遺伝子の発現抑制が起きてしまったことが推測される (図 2-12B)。そのため、従来の Y2H 法で SAMSs と SIDEELLA の相互作用を確認することは難しいかもしれない。異なる Y2H 法、もしくは大腸菌もしくは植物での一過的な発現誘導を用いた共免疫沈降法などの実験によって相互作用を評価する必要があると考えられた。

CNR13 と SIDEELLA の相互作用の検証

次に SIDEELLA と SICNR13 の相互作用を検証した。*SICNR13* は Cell number regulator (CNR) ファミリーに属する *FW2.2/SICNR2* 遺伝子のホモログの一つである。*FW2.2/SICNR2* はトマトの栽培化における果実重増加の 30%程度寄与する QTL である *fw2.2* の原因遺伝子をコードしており、具体的な機構は不明であるが細胞分裂を抑制的に制御することが報告されている (Frery *et al.*, 2001)。また、*FW2.2/SICNR2* は細胞膜上でタンパク質のリン酸化に関わるセリンスレオニンキナーゼの一つである CASEIN KINASE II (CKII) と相互作用して、下流のシグナル伝達を制御することが示唆されている (Cong and Tanksley, 2006)。一方で、イネの DELLA タンパク質 SLR1 は CASEIN KINASE I (CKI) である Early Flowering 1 (EL1) によってリン酸化されることが報告されている (Dai and Xue, 2010)。以上を踏まえ、SIDEELLA と SICNR13 の相互作用の

SIDELLA の翻訳後修飾への関与を考え相互作用を検証した。

その結果、SIDELLA を単独に導入した場合と比較して、SIDELLA と SICNR13 を同時に導入した場合は、高濃度の 3-AT を添加した培地上でも、SICNR13 を導入していない細胞に比べてよく生育していた (図 2-13A, B)。この結果は、SIDELLA と SICNR13 弱い相互作用を示唆する。ただし、実験の再現性は認められたものの生育の程度の差が小さいため、偽陽性の可能性も捨てられない。FW2.2/SICNR2 や他の CNR ファミリーメンバーは細胞膜に局在し機能することが示唆されている (Cong and Tanksley, 2006) ことから、今回の実験では相互作用を正確に評価できていないかもしれないため、今後の解析から除外した。

2-3-3-2 スクリーニング 2 の選抜候補と SIDELLA の相互作用の検証

スクリーニングにより SIDELLA との相互作用が示唆された 17 個の CDIs と SIDELLA 全長との相互作用を検証した結果、CDI3, CDI5, CDI7 との相互作用が確認された (図 2-14, 15, 16)。CDI11 及び CDI12 は強いオートアクチベーションを示したため、今回のシステムを用いて相互作用を確認することは出来なかった。これらについては今後 Split Ubiquitin Yeast two hybrid (Dünkler *et al.*, 2012) や Split Ubiquitin based Membrane Yeast Two hybrid (Snider *et al.*, 2010) などの改良版の Y2H 法を用いて相互作用を検証する必要があると考える。

2-3-5 第 2 章のまとめ

第 2 章では、SIDELLA を介した GA シグナルの果実発達における役割を明らかにするために、1) SIDELLA の分解機構の中核である GA 受容体 SIGID1 と SIDELLA の相互作用、2) SIDELLA の果実発達における相互作用因子の単離に取り組んだ (図 2-20)。

まず、1) の結果、トマトの SIDELLA と 3 つの SIGID1 の GA 非存在下及び GA 存在下での相互作用を確認した。さらにトマトでは GID1ac ファミリーのメンバーが GA 非依存的に DELLA と相互作用することを発見した。これは他の植物でも報告されていない現象で GA 受容体 *GIDI* 遺伝子の進化を考える上で重要な知見と考えられた。

次に、1) で整備した手法を用いて 2) を実施した結果、SIDELLA の相互作用因子を 3 遺伝子 (CDI3, CDI5, CDI7) 同定した。第 3 章では *CDI5* の果実発達における役割を明らかにすることを目的に研究を進めることにした。

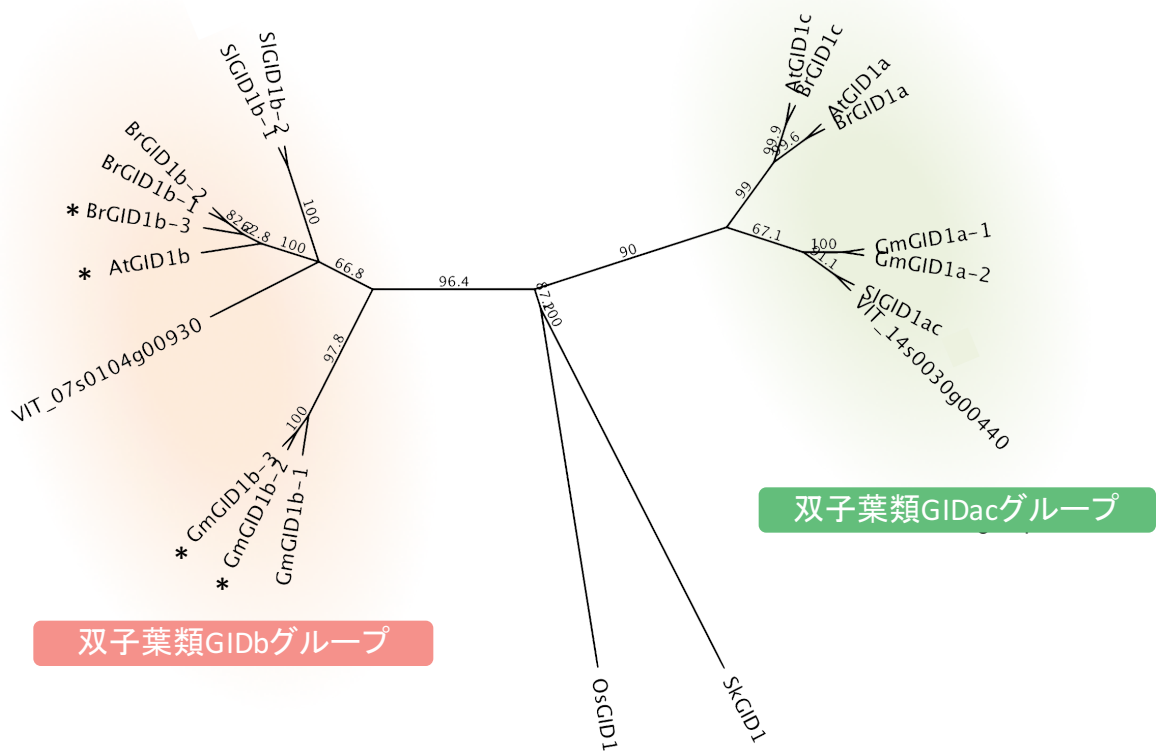
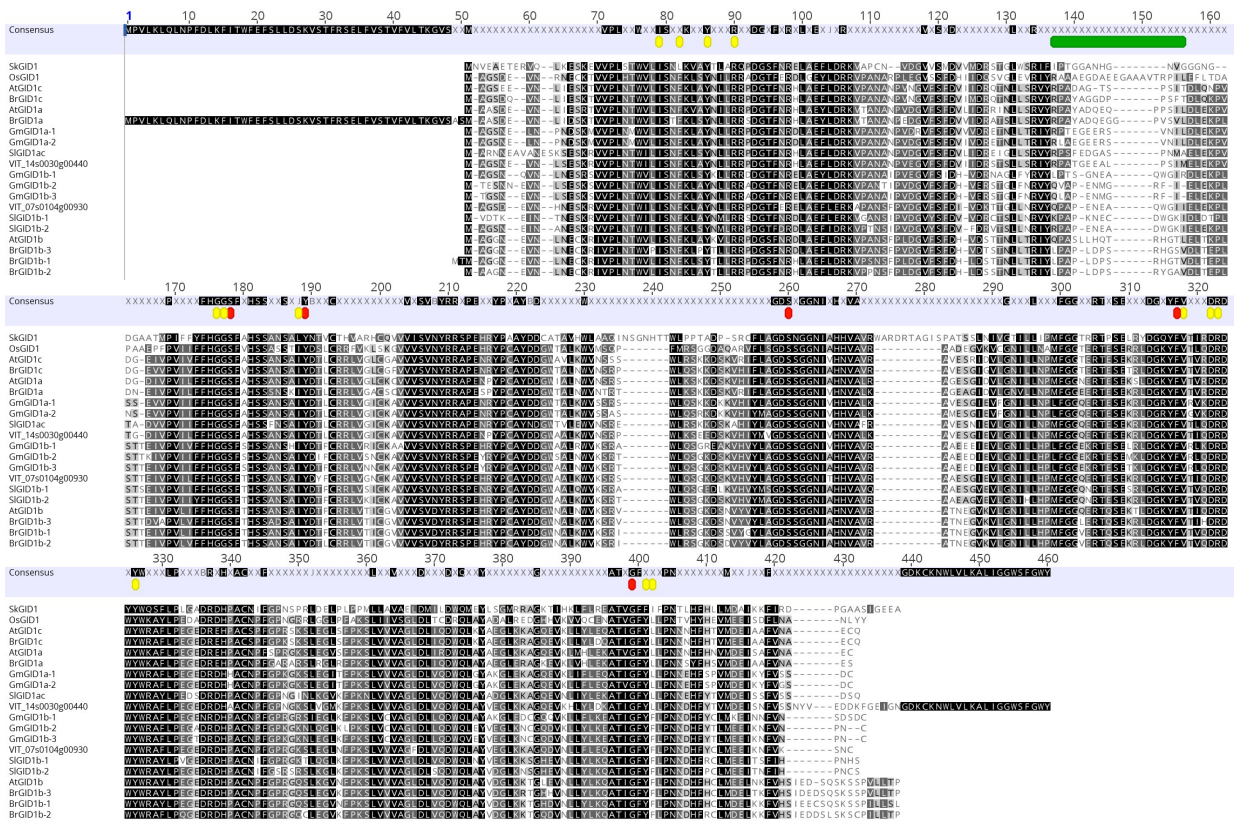


図2-1. GA受容体GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) ファミリーの系統樹

ジベレリン (Gibberellic acid, GA) 受容体GID1ファミリータンパク質の系統樹. 双子葉類のGA受容体はGID1acタイプおよびGID1bタイプのサブグループに分類される. トマトは1つのGID1acタイプと2つのGID1bタイプのGA受容体遺伝子を持つ. 一部のメンバー(*)は, GA非依存的にDELLAと相互作用する (Yamamoto *et al.*, 2010). At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza satiba*; Gm, *Glycine max*; Br, *Brassica rapa*; VIT, *Vitis vinifera*; Sk, *Selaginella kraussiana* .

A)



B)

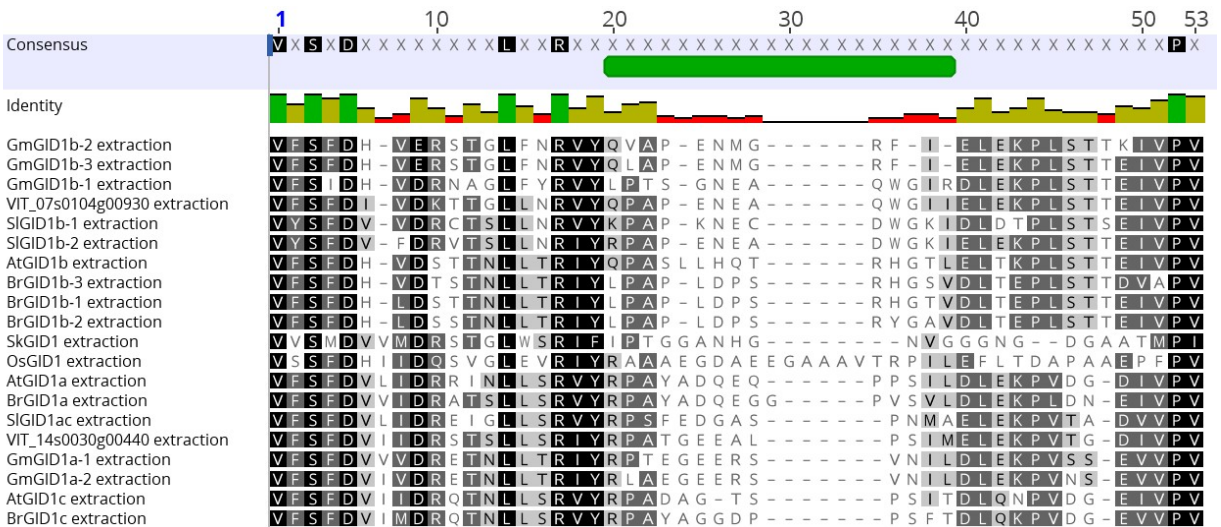


図2-2. GA受容体GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) ファミリーのアラインメント

A) ジベレリン (Gibberellic acid, GA) 受容体GID1ファミリータンパク質のアミノ酸配列のアラインメント。トマトは2つのGID1bタイプと、1つのGID1acタイプのGA受容体を持つ。GAとの水素結合 (赤) 及びその他の結合 (黄) に関するアミノ酸を示した。また、DELLAとのGA非依存的な結合に関与するループ領域 (緑枠) を示した。B) ループ領域周辺のアミノ酸配列。生物間でも生物内でも配列の保存性が低い。At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Gm, *Glycine max*; Br, *Brassica rapa*; VIT, *Vitis vinifera*; Sk, *Selaginella kraussiana*。

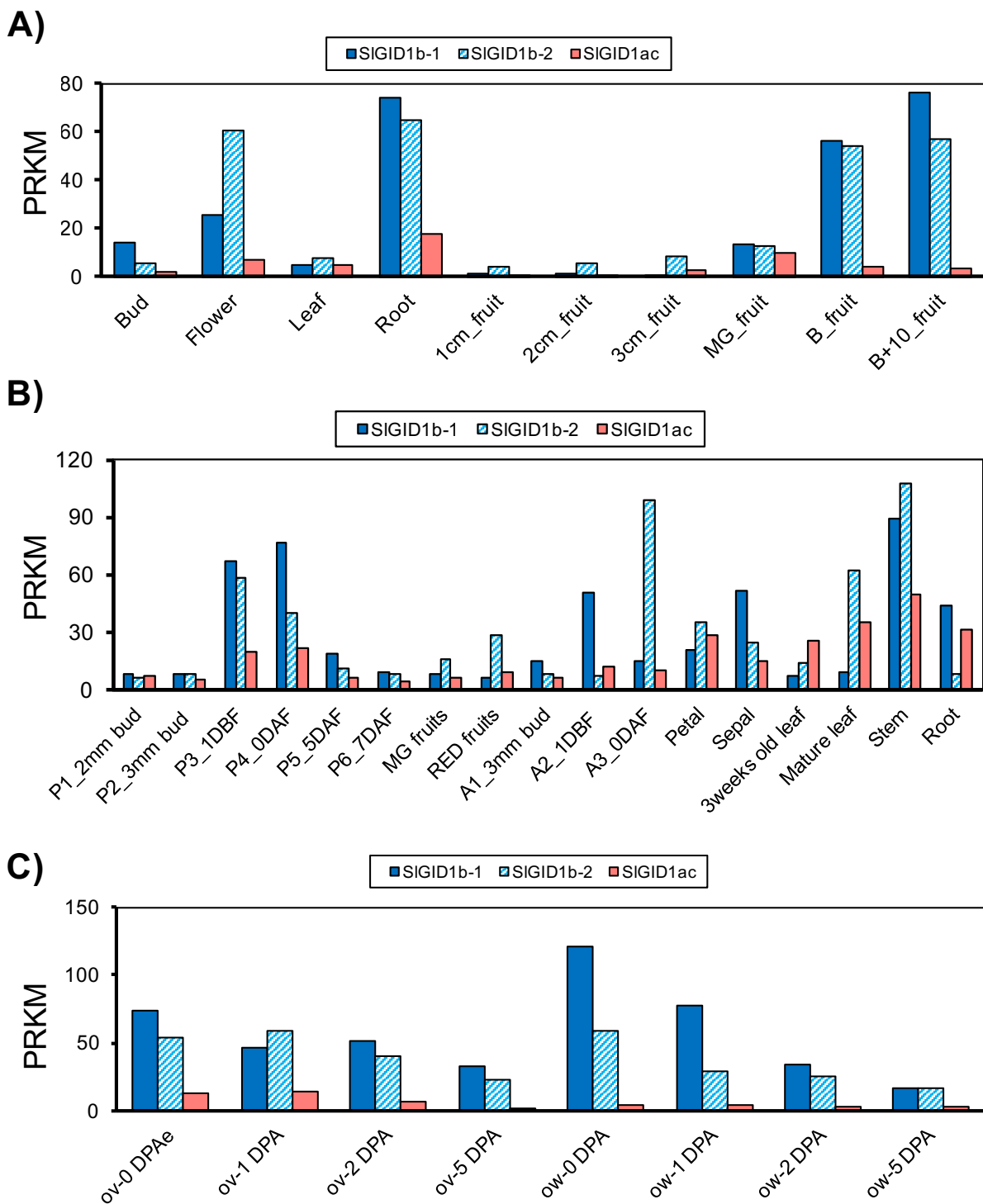


図2-3. GA受容体GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1 (GID1) ファミリー遺伝子のトマトでの発現

A) トマト品種 ‘Heinz 1706’ での発現 (Tomato genome consortium, 2012). 緑熟期 (MG), プレーカー着果実 (B). B) トマト品種 ‘Micro-Tom’ での発現 (Ezura *et al.*, 2017). 雌蕊 (P), 葯 (A), 開花前 (DBF), 開花後 (DAF). C) トマト品種 ‘Moneymaker’ の雌蕊での発現 (Zhang *et al.*, 2017). ov, ovule (胚珠); ow, ovary wall (子房壁); DPA, days after pollination (受粉後日数). 0 DPAは受粉前のしずい由来サンプル. RPKM, Reads per kilobase of exon model per million mapped reads.

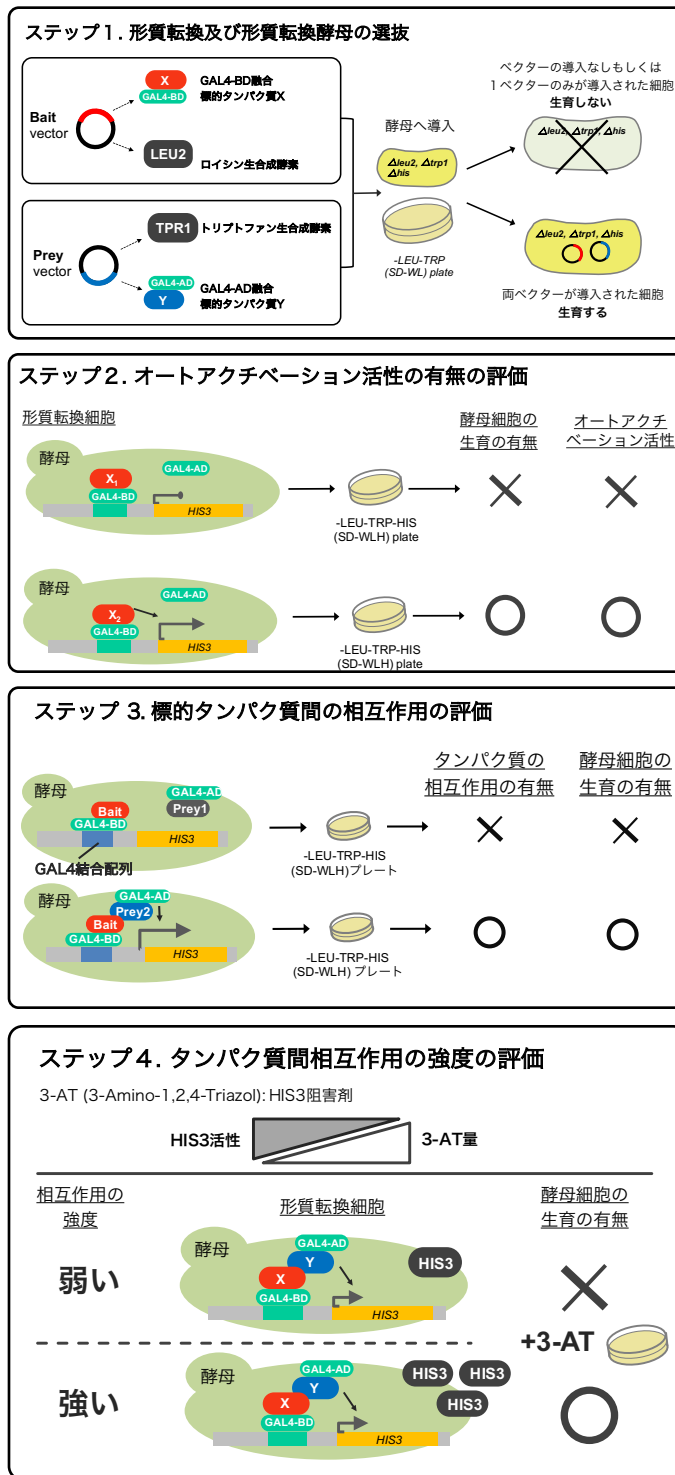


図2-4. Yeast Two Hybrid (Y2H) システム

ステップ1) 酵母の形質転換と形質転換細胞の選抜. Baitベクター及びPreyベクターにはそれぞれロイシン生成酵素遺伝子 (*LEU2*) 及びトリプトファン生成酵素遺伝子 (*TRP1*) がコードされており, それらの酵素が欠損している酵母PJ69-4A株は, 2つのベクターが導入された場合のみSD-WL培地上で生育できる. 標的タンパク質には, GAL4由来DNA結合ドメイン (GAL4-BD) もしくはGAL4由来転写活性化ドメイン (GAL4-AD) をそれぞれ融合している. ステップ2) Baitタンパク質のオートアクチベーション活性の確認. 相互作用するPreyタンパク質を同時に導入しない場合でも, オートアクチベーション活性を持つタンパク質 (X_2) をBaitとして利用するとSD-WLH培地で生育する. ステップ3) 相互作用の評価. 酵母PJ69-4A株はヒスチジン生成関連酵素遺伝子 (*HIS3*) が欠損しているため, 相互作用が起こり*HIS3*の発現が誘導される場合にのみSD-WLH培地上で生育する. ステップ4) 相互作用の強度の評価. 相互作用評価培地へ3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) を添加することで, タンパク質の相互作用によって誘導される*HIS3*の活性を添加量依存的に阻害できる. それにより, 相互作用が強い組み合わせほど濃い3-AT濃度下でも細胞が生育できるため, 相互作用の強度が検討できる.

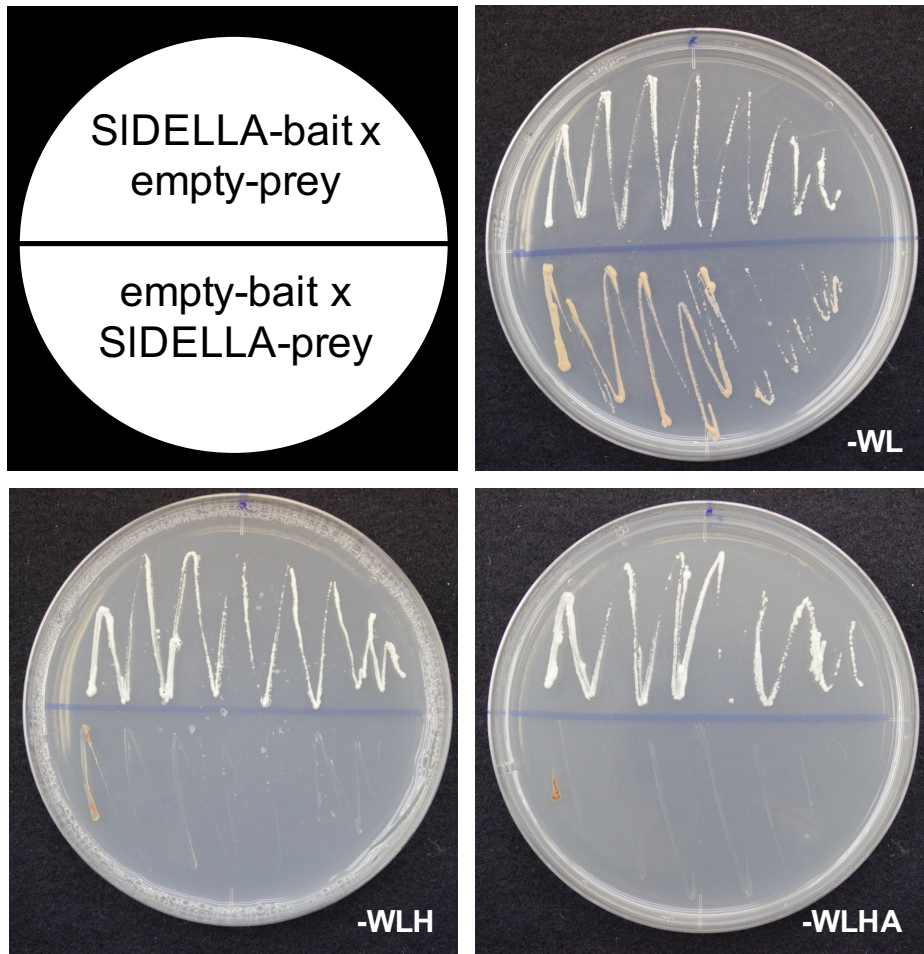


図2-5. SIDELLAのオートアクチベーション活性

オートアクチベーション活性の有無の確認実験. *SIDELLA*のコーディング領域全長をクローニングしたpDEST32ベイトベクター (SIDELLA-bait) とpDEST22プレイベクター (empty-prey) と共に酵母PJ694A株へ導入すると, コントロール培地であるSD-Leu-Trp プレート (SD-WL), 選抜培地であるSD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) およびSD-Leu-Trp-His-Ade プレート (SD-WLHA) 上での生育が確認された (プレート上部). 一方で, empty-bait及びSIDELLA-preyの組み合わせでは, SD-WLのみで酵母の生育が確認された. プレートに菌を摂取し, 30°Cで3日間培養後に観察した. ($n = 2$).



(Shinozaki *et al.* unpublished)

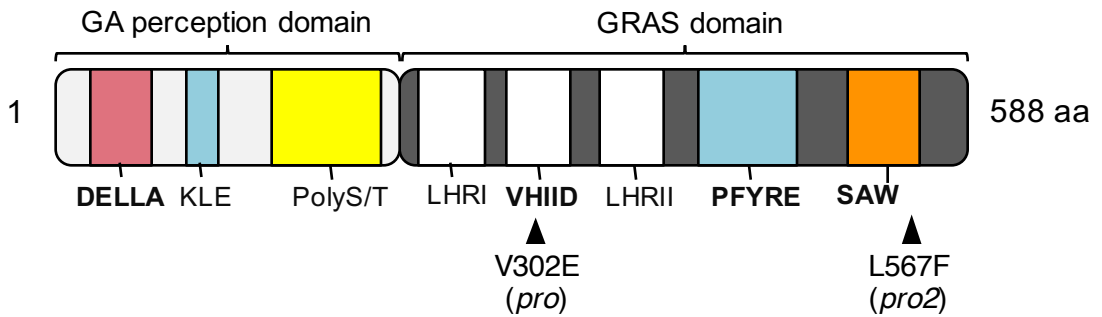


図2-6. *sidella*変異体

野生型 (WT) と比較して, *sidella* 変異体 (*pro*, *pro-2*) はジベレリン (Gibberellic acid, GA) シグナル亢進に伴う徒長を示す. *pro-2* 変異体はSIDELLAのGRASドメイン内のSAWドメインに変異 (L567F), *pro* 変異体はSIDELLAのGRASドメイン内のVHIIDドメインに変異 (V302E) を有する. 播種後6週間の植物体. スケールバー = 1 cm. aa, amino acid (アミノ酸).

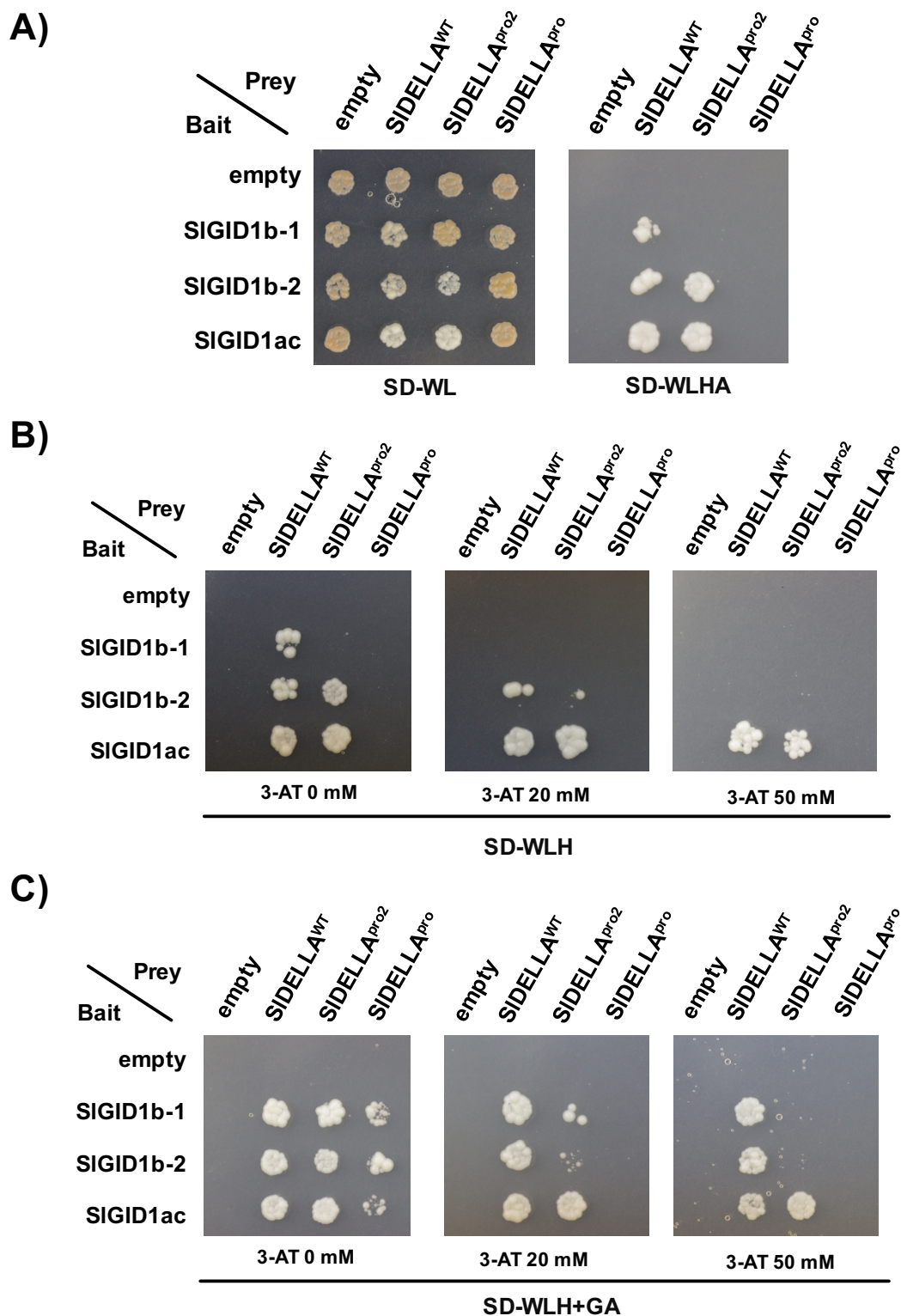


図2-7. SIDELLAとSIGID1sの相互作用また*pro*変異及び*pro2*変異の影響

A) 酵母形質転換体 (PJ69-4A株) のSD-Leu-Trp (SD-WL) プレート (コントロール培地) またはSD-Leu-Trp-His-Ade (SD-WLHA) プレートでの生育. B) 酵母形質転換体 (PJ69-4A株) の3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) 添加 SD-Leu-Trp-His (SD-WLH) プレートでの生育. C) 酵母形質転換体 (PJ69-4A株) の3-AT添加 SD-WLH +100 μ M GA₃プレートでの生育. SIGID1ファミリーメンバーをBait, SIDELLAおよびバリエーションをPreyに用いた. 30°Cで5日間培養後に撮影. (*n* = 2).

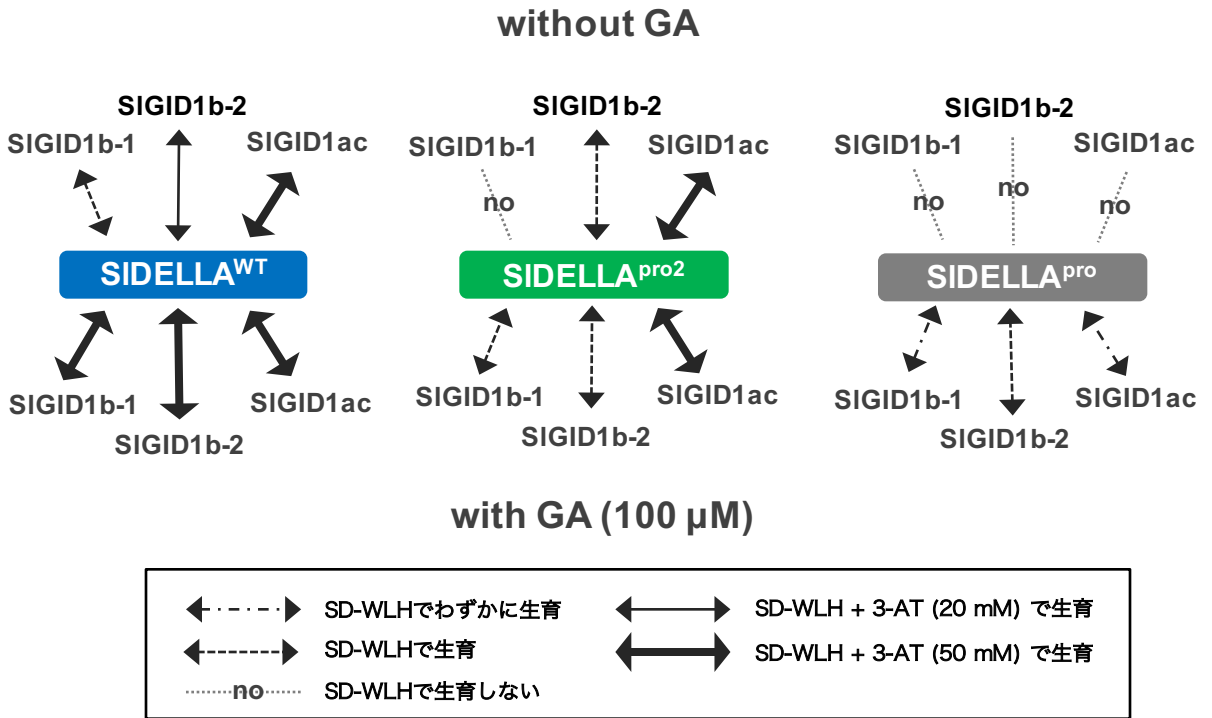
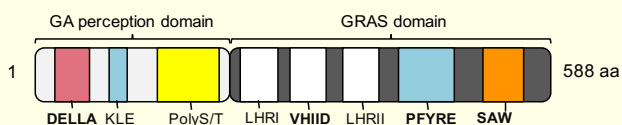


図2-8. SIDELLAとSIGID1sの相互作用

SIDELLAはジベレリン (Gibberellic acid, GA) 非存在下で3つのGA受容体SIGID1sと相互作用する。SIGID1acはGA存在下及びGA非存在下双方で強くSIDELLAと相互作用する。SIGID1b-1及びSIGID1b-2は、GA非存在かと比較してGA存在下でSIDELLAとの相互作用が強まる。SIDELLA^{pro2}はSIGID1sとの相互作用が低下していると示唆される。SIDELLA^{pro}は相互作用が低下しているか、発現が低下しているか、もしくはタンパク質の安定性が低下していると示唆される。

SIDELLAの二次構造と機能ドメイン



DELLAドメイン：DELLAの分解機構

GRASドメイン：DIPsとの相互作用

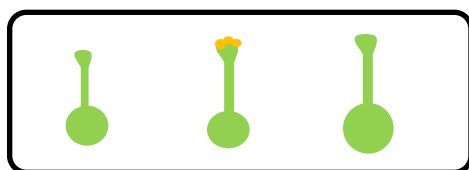
スクリーニング 1

PFYRE (109 aa) SAW (79 aa)



×

×



雌蕊由来cDNAライブラリー

Matchmaker system

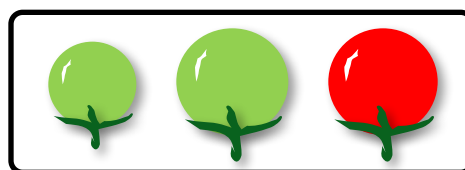
20 遺伝子

スクリーニング 2

GRAS domain (393 aa)



×



果実由来cDNAライブラリー

ULTimate Y2H SCREEN

37 遺伝子

図2-9. SIDELLA相互作用因子のスクリーニング

スクリーニング1) SIDELLAのGRASドメインに含まれる2つのサブドメイン (PFYREドメイン, SAWドメイン) をBaitに, トマト雌蕊のトータルRNAより作成したcDNAライブラリーを用いて選抜した. Matchmaker system (Clontech, USA) を利用した. スクリーニング2) DELLAのGRASドメイン全長をBaitに, トマト果実のトータルRNAより作成したcDNAライブラリーを用いて選抜した. ULTimate Y2H SCREEN (Hybrigenics SA, France) を利用した. DELLA-INTERACTING PROTEINS, DIPs; aa, amino acid.

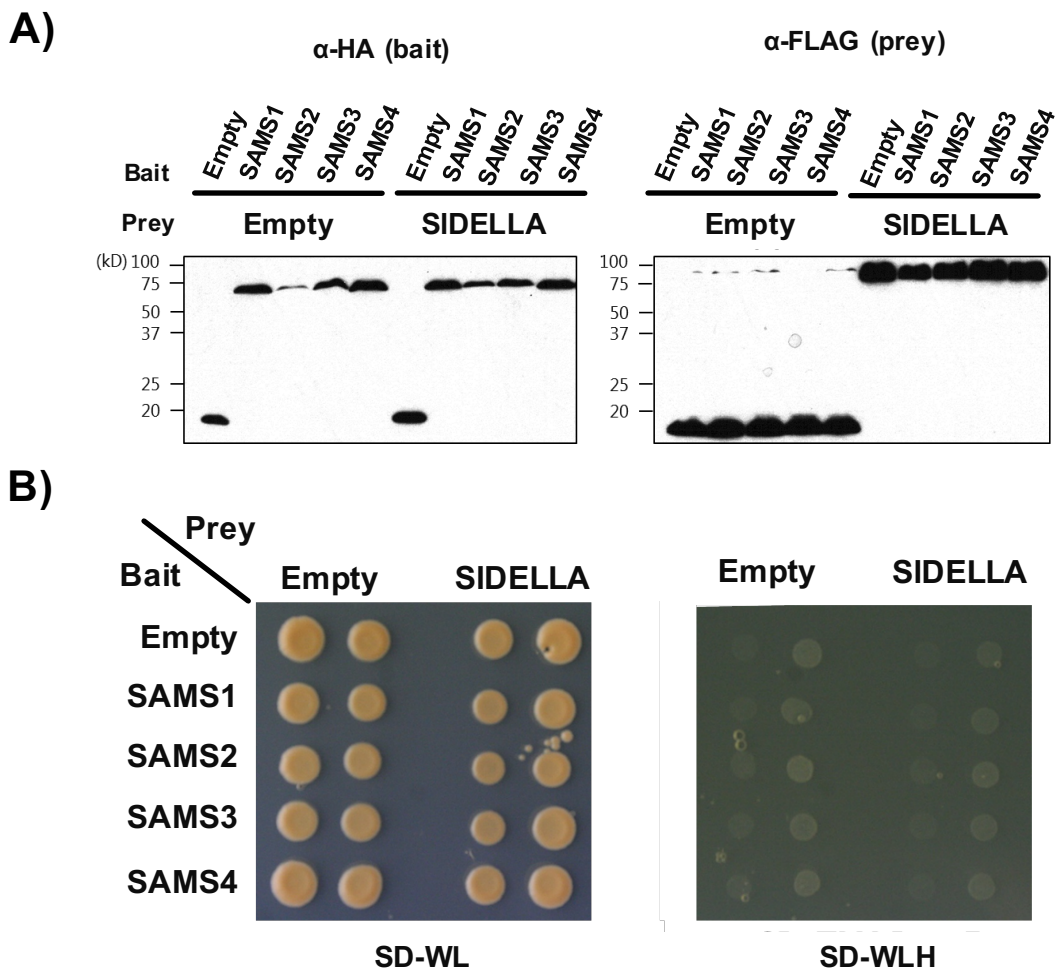
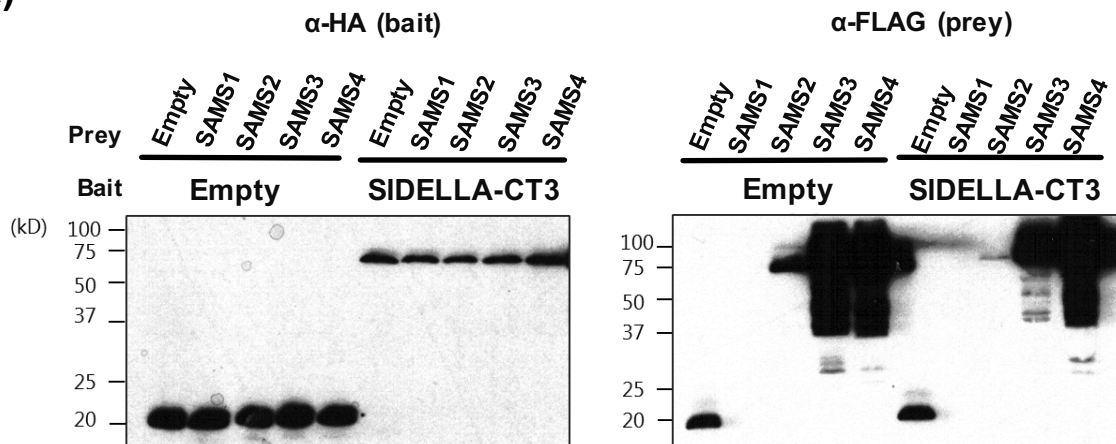


図2-10. SAMSSとSIDE L LAの相互作用の検証1

A) ウェスタンブロッティング実験. Baitベクター(左)及びPreyベクター(右)の発現: BaitはHA抗体, PreyはFLAG抗体を用いてタンパク質の検出を行い, Bait及びPreyの組換えタンパク質はいずれも発現が確認された. ターゲットのサイズ: Bait-empty (20kDa), SAMSS1-4 (43kDa+20kDa), Prey-empty (20kDa), SIDE L LA (64kDa+20kDa). ($n = 2$). B) Yeast two hybrid実験. SAMSS1-4をBaitにSIDE L LAをPreyにしてYeast two hybrid実験を行った結果, SD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) での形質転換体の生育は確認されなかった. *HIS3*遺伝子の発現が誘導されていないことを示唆する. 細胞は2段階のOD値に希釈して播いた(左を1として右が5倍濃度). ($n = 3$).

A)



B)

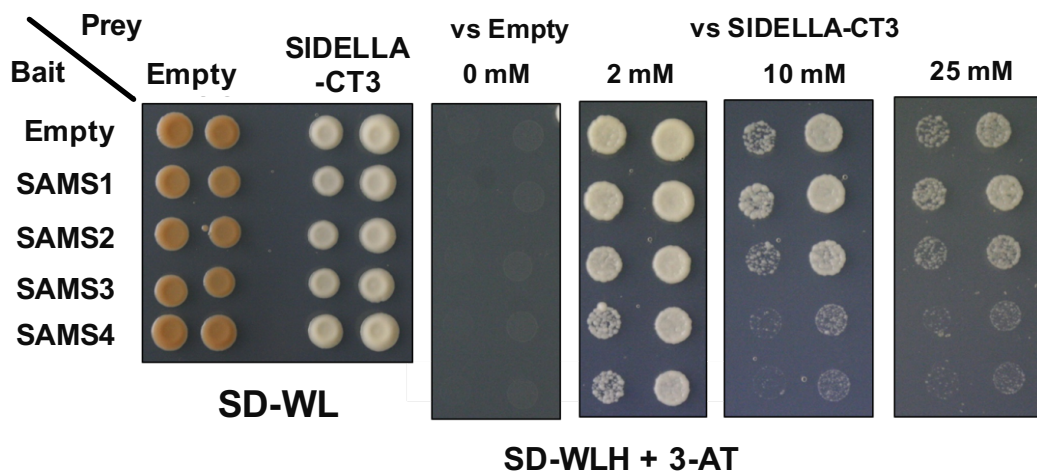
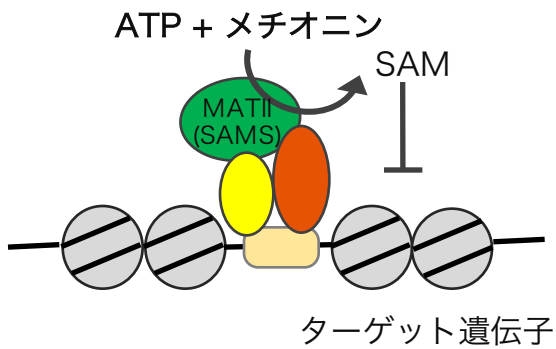


図 2-11. SAMSsとSIDELLAの相互作用の検証2

A) ウェスタンブロットティング実験. Baitベクター (左) 及びPreyベクター (右) の発現 : Bait はHA抗体, PreyはFLAG抗体を用いてタンパク質の検出を行った. SAMS1を除いてすべてのBait及びPreyの組換えタンパク質の発現が確認された. ターゲットのサイズ : Bait-empty (20kDa), SIDELLA-CT3 (44kDa+20kDa), Prey-empty (20kDa), SAMS1-4 (43kDa+20kDa). ($n = 2$). B) Yeast two hybrid実験. SIDELLAのC末を削ったSIDELLA-CT3をBaitに, SAMS1-4をPreyにYeast two hybrid実験を行った. その結果, SIDELLA-CT3はautoactivation能がありSD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) でも生育するが, SAMS3及びSAMS4を同時に発現させた場合は形質転換体の生育は抑制された (3-AT 10 mM, 25 mM). SIDELLA-CT3による*HIS3*遺伝子の発現誘導を抑制することが示唆された. 細胞は2段階のOD値に希釈して播いた (左を1として右が5倍濃度). ($n = 3$).

A)



B)

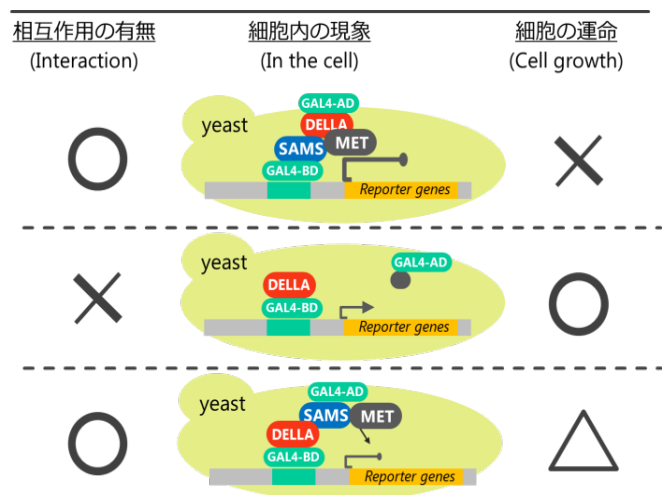
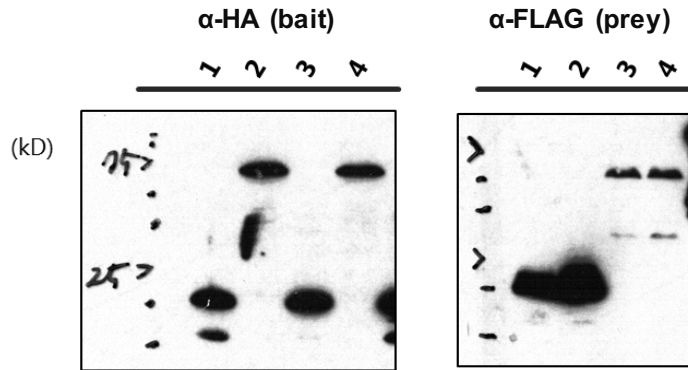


図2-12. S-adenosylmethionine synthesis (SAMS) による遺伝子の発現抑制抑制モデル。

A) ヒトで提唱されているSAMS (MAT2a) の転写抑制複合体; DNA結合因子 (赤及び黄色) と相互作用し、ゲノム上の特定の領域でメチル化の基質であるSAMの供給を行い下流の遺伝子の発現抑制を行う (Katoh *et al.*, 2011). B) トマトSAMSによる酵母内での転写抑制のモデル; SAMSがDNA結合能を有する場合 (SIDELLAと相互作用もしくはDNA結合ドメインの融合), レポーター遺伝子の発現抑制を行う可能性がある. GAL-AD, GAL4由来転写活性化ドメイン; GAL-BD, GAL4由来DNA結合ドメイン; MET, Methyltransferase.

A)



B)

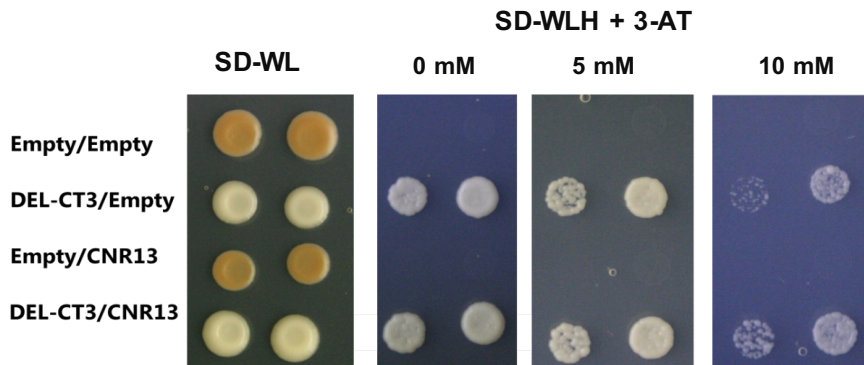


図2-13. SIDEELLAとSICNR13の相互作用の検証

A) ウェスタンブロッティング実験. Baitベクター(左)及びPreyベクター(右)の発現: BaitはHA抗体, PreyはFLAG抗体を用いてタンパク質の検出を行った. すべてのBait及びPrey組換えタンパク質の発現が確認された. ターゲットのサイズ: Bait-empty (20kDa), SIDEELLA-CT3 (GRASドメイン) (44kDa+20kDa), Prey-empty (15kDa), SICNR13 (26.3kDa+20kDa). ($n=2$). B) Yeast two hybrid実験. SIDEELLAのC末を削ったSIDEELLA-CT3をBaitに, SICNR13をPreyにYeast two hybrid実験を行った結果, SIDEELLA-CT3 (Bait) とempty (Prey) を導入した場合に比べ, SIDEELLA-CT3 (Bait) とSICNR13 (Prey) を導入した場合は高い3-AT条件下でも若干生育がよかった. SICNR13がSIDEELLAと弱く相互を示す可能性がある. 細胞は2段階のOD値に希釈して播いた(左を1として右が5倍濃度). ($n=2$).

A)

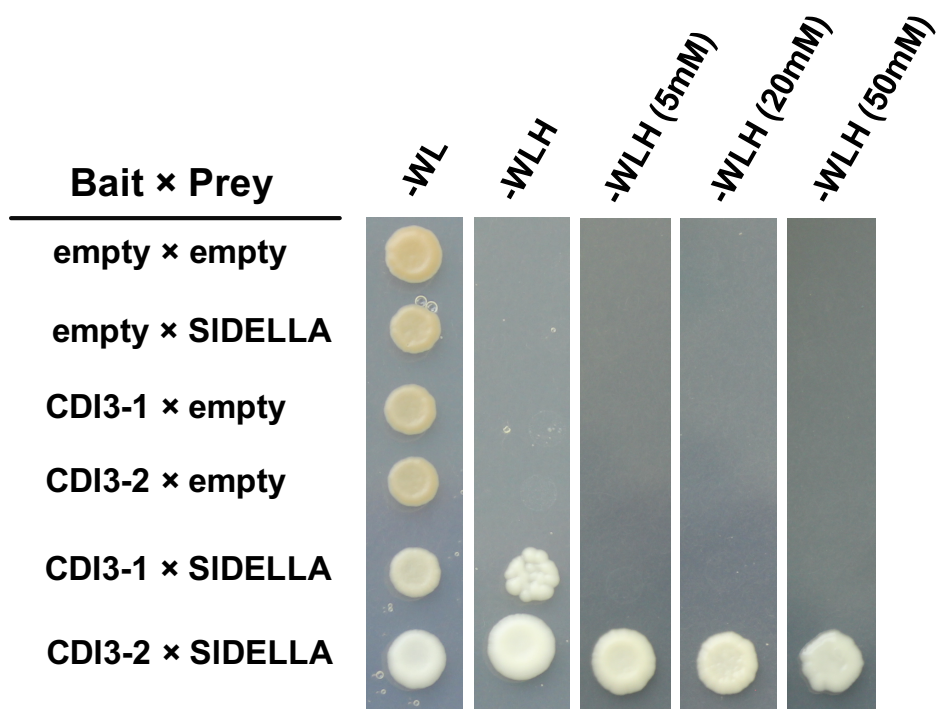


図2-14. CDI3とSIDELLAの相互作用の検証

A) CDI3の全長 (CDI3-1) 及びCDI3のDUF724ドメイン (CDI3-2) をBaitに, SIDELLAの全長をPreyにしてYeast two hybrid 実験を行った. その結果, CDI3-1とSIDELLAを導入した場合, SD-WLHで生育が確認されたことからCDI3とSIDELLAは弱く相互作用すると考えられた. 一方で, CDI3-2とSIDELLAを導入した場合には, 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) を50 mM 添加したSD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) でも生育が確認されたことから, SIDELLAはCDI3-2と強く相互作用する. カッコ内の数字は培地に添加した3-AT濃度を示す. ($n = 2$).

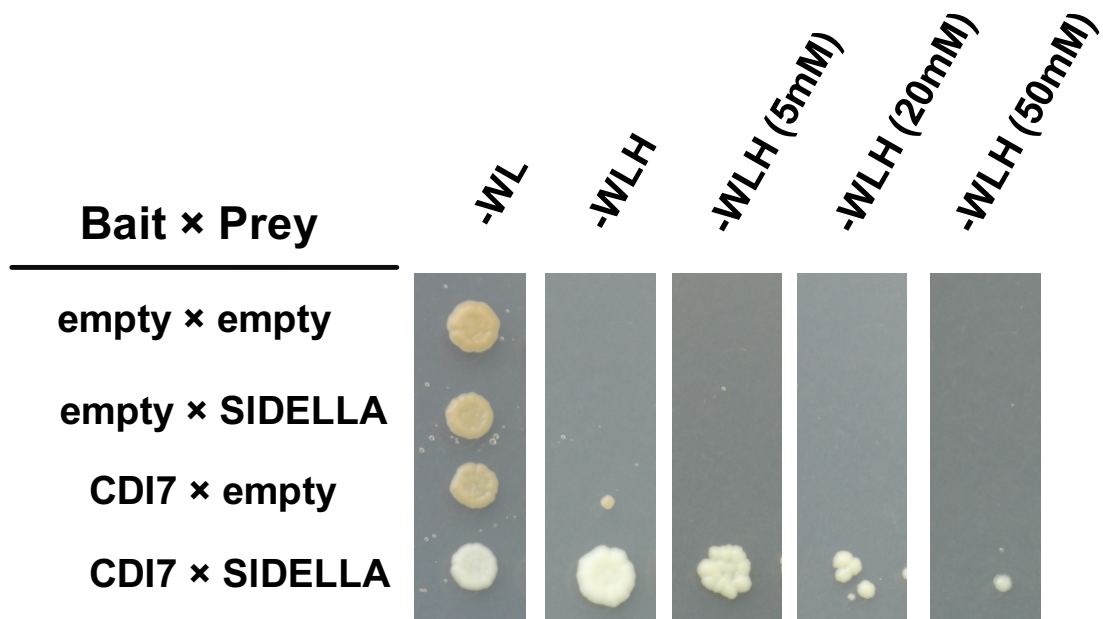


図2-15. CDI7とSIDELLAの相互作用の検証

CDI7の全長 (CDI7) をBaitに, SIDELLAの全長をPreyにしてYeast two hybrid実験を行った. CDI7とSIDELLAを導入した場合にSD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) 及び3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) を5 mM 添加したSD-WLHでも生育したことから, SIDELLAはCDI7と相互作用することが示された. カッコ内の数字は培地に添加した3-AT濃度を示す. ($n=2$).

A)

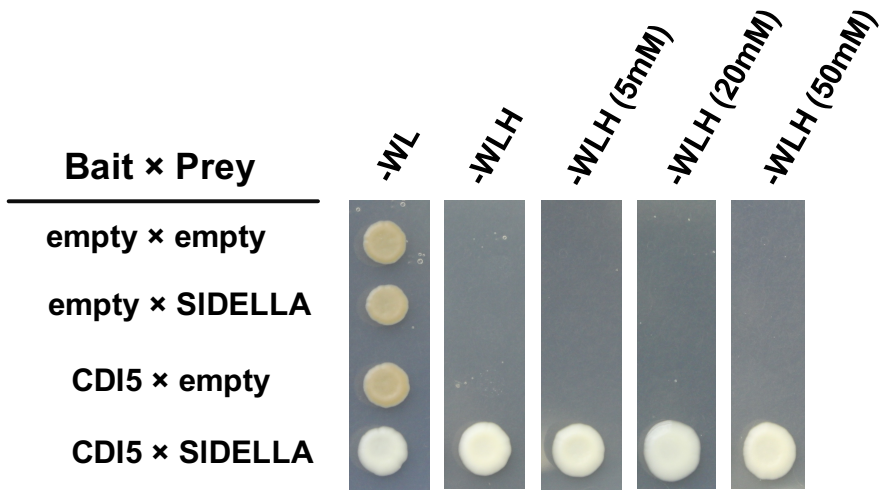


図2-16. CDI5とSIDELLAの相互作用の検証

Yeast two hybrid実験. A) CDI5全長とSIDELLA全長の相互作用. CDI5の全長 (CDI5) をBaitに, SIDELLAの全長をPreyにYeast two hybrid実験を行った. その結果, CDI5とSIDELLAを導入した場合に3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT) を50 mM 添加したSD-Leu-Trp-Hisプレート (SD-WLH) でも生育が確認されたことから, SIDELLAはCDI5と強く相互作用することが支持された. ($n=2$).

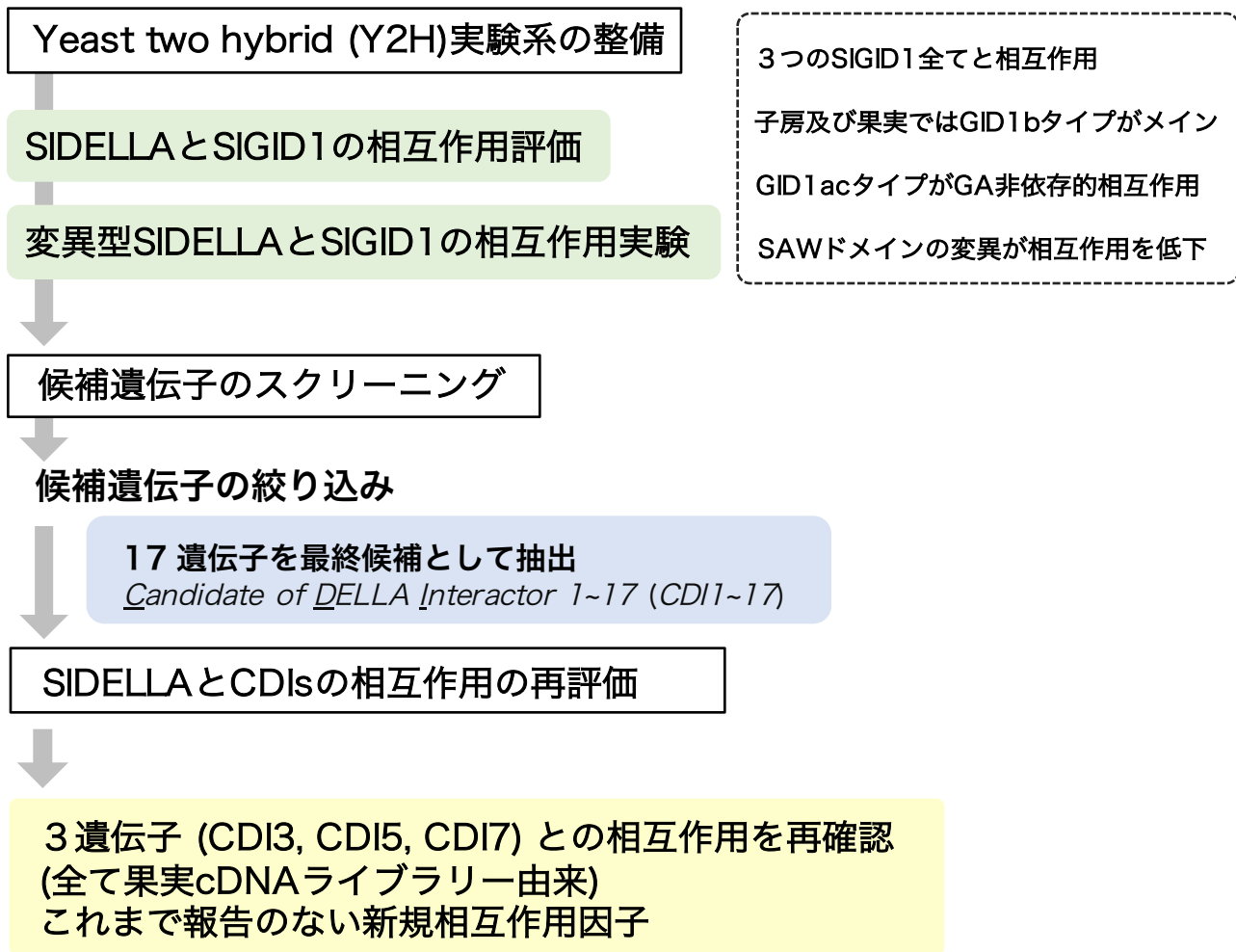


図2-17. 第2章の解析のまとめ

本研究で、SIDEELLAとジベレリン (Gibberellic acid, GA) 受容体SIGID1sの相互作用が始めて実験的に示された。発現量からGID1bタイプのSIGID1b-1及びSIGID1b-2が子房・果実発達でメインのGA受容体と考えられた。変異型SIDEELLAとSIGID1の相互作用実験から、SAWドメインがSIDEELLA-SIGID1相互作用に関与することが支持された。整備したY2H実験系を用いて、SIDEELLAの新規相互作用因子のスクリーニングを行った結果、これまでに報告のない新規DELLA相互作用因子を3遺伝子選抜した。

第4章

総合考察

本研究ではジベレリン (GA) の果実発達における役割を明らかにすることを目的として、第一章ではトランスクリプトーム解析を用いて着果時期雌蕊で特異的に発現する GA シグナル関連遺伝子を選抜し、第二章では Yeast Two hybrid (Y2H) 法を用いて SIDELLA の新規相互作用因子を単離した。第三章では *CDI5* の果実発達における機能を解明するため、*CDI5* の形質転換体を作成し、その解析を行った。

トマトには GA シグナルを抑制する *DELLA* 遺伝子が 1 つ (*SIDELLA/PROCERA*) 存在し、その遺伝子発現抑制や機能欠損により恒常的に GA 応答が引き起こされる (Bassel *et al.*, 2008; Jasinski *et al.*, 2008; Marti *et al.*, 2007; Carrera *et al.*, 2012)。シロイヌナズナの研究から GA に起因する生理反応はほぼ *DELLA* 遺伝子を介すると考えられており、トマトでも *SIDELLA* を介する GA 応答遺伝子の割合は高く 95% と見積もられており、GA シグナルの大部分は *SIDELLA* によって制御されていると考えられている (Livne *et al.*, 2015)。*SIDELLA* 遺伝子の機能欠損型変異体の 1 つである *procera* (*pro*) (図 9A) は、恒常的 GA 応答により、植物体の徒長並びに受粉及び受精に依存せず果実形成が誘導され“タネ無し”果実が形成される単為結果性を示す (図 9B, C)。また、*pro* 変異体は果実成熟もしくは着色の遅延を引き起こす (篠崎ら, 未発表; 図 9D)。シロイヌナズナの研究で *DELLA* を介する GA シグナル経路がクロロフィルやカロテノイド類の蓄積を抑制する役割を持つことが示めされている (Cheminant *et al.*, 2011)。また、GA 処理によりトマトの果実着色が抑制されることも報告されている (Dostal and Leopold, 1967)。即ち、*SIDELLA* 依存的な GA シグナル経路が、果実成熟もしくは果実着色の調節にも関与することが示唆される。しかし、現在までにその具体的な作用メカニズムは明らかにされてきていない。その要因として、*SIDELLA* の下流遺伝子や、その発現制御に直接関与する *SIDELLA* 相互作用因子 (*DELLA*-interacting proteins, DIPs) についての知見が不足していることに起因している。そこで、本研究の達成目標として、(1) トマト果実発達における組織特異的な GA シグナル経路を解明する、(2) トマト果実発達における GA シグナルへ関与する新規 DIPs を単離する、(3) トマト果実発達における新規 DIPs の機能を明らかにする、(4) *SIDELLA* と新規 DIPs の相互作用の果実発達における役割を考察することの 4 つを設定した。以下に本研究で明らかになったことを示す。

第 1 章では、*SIDELLA* 依存的な GA シグナル経路の果実発達における役割を明らかにするため、比較的研究が進展している着果時の GA の役割に着目した。これまでに、*pro* 変異体や GA 処理をした着果時の雌蕊を用いたトランスクリプトーム解析から、着

果時期の雌蕊において、GA シグナルによって制御されている遺伝子群の単離が試みられてきている (Carrera *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2015). これらの研究により、着果時に発現変動する多数の遺伝子群を網羅的に同定することを主目的にしており、遺伝子の組織別の発現パターンなどを考慮した議論は乏しかった。

そこで本研究では、雌蕊特異的発現遺伝子 (*Pistil-specific genes, PSGs*) に着目し、着果に関連した *SIDELLA* に依存的な GA シグナルによって制御される *PSGs* の探索を行った。その結果、(1) *PSGs* のうち約半数は機能未知遺伝子である (表 1-1, 2, 4), (2) *PSGs* は胚珠や種子優先的な発現を示す (図 1-3A, 表 1-3), (3) 着果に関連した *SIDELLA* 依存的な GA シグナルにより制御される *PSGs* の多くは着果時に遺伝子発現が抑制される、の3点がわかった (図 1-5, 6; 表 1-5). (1) に関して、多くの *PSGs* が機能未知であるのは、局所的な発現パターンによって変異体集団を作製した場合などに表現型が見つけづらく、研究対象になりにくかったためと考えられた。(2) に関して、着果を抑制制御する鍵因子 *SHAA9* や *SIAGL6* が胚珠で特に優先的に発現しており、受精・受粉が起こる前には胚珠が着果を抑制する役割を担っていることが示唆されている (Wang *et al.*, 2009; Klap *et al.*, 2016). *PSGs* は着果にも重要な胚珠や種子で優先的に発現していることは、これらの遺伝子が着果に関与することを示唆する結果であった。(3) において、着果に関連した *SIDELLA* に依存的な GA シグナルによって制御される *PSGs* (*PS-GRGs*) には、着果後に遺伝子発現が低下するものが多く含まれていた (表 1-5, 図 1-6). *PS-GRGs* のうち 13 遺伝子は着果後に発現が低下されて (グループ 1), 8 遺伝子は開花日時点で野生型と比べて低い発現量であった (グループ 2). グループ 1 は、開花時期までは野生型と同様の発現パターンを示し、着果した子房において、着果しない子房と比べて遺伝子発現量が低下していたことから *SIDELLA* による直接的な制御を受けている可能性が示唆された。Vriezen ら (2011) あるいは Tang ら (2015) の報告では、植物特有の転写因子 ERF や *MADs-box* ファミリー遺伝子群が着果時に特異的に減少する。本研究の結果と併せ、着果を抑制している因子群の抑制解除により着果が誘導される機構の存在が予想される。また、*PS-GRGs* の中には、胚珠の外珠皮の発達に重要な *INO* 遺伝子 (Villanueva *et al.*, 1999) のホモログや、受精に重要な植物ホルモンの 1 つである *EGG CELL 1 (EC1)* (Sprunck *et al.*, 2012) のホモログが含まれたのは興味深い点である (図 1-4). *EC1* ファミリーの選抜し *pro* 変異体の着果時期子房の発現を確認したところ、野生型と比較して *pro* 変異体では開花時点から開花後の未受粉子房でも *EC1* ファミリー全

体の発現が低下していた (図 1-8E). このことから, 未受粉時では胚珠で発現する因子群が発現することで着果が抑制され, 着果時の遺伝子発現低下が着果を誘導するのかもしれない. 加えて, GA シグナルの活性化により単為結果が誘導されるトマト品種は, 一般的に自殖時の採取性が低いことが知られ, これは子房内での花粉管の伸長阻害や胚の発達に起因する可能性が示唆されている (Kataoka *et al.*, 2003, 2008; 大川, 2011; Carrera *et al.*, 2012). そのため, *pro* 変異体を含む GA シグナルによって誘導される単為結果性系統に見られる自殖時の採取性の低下は, SIDELLA を介した ECI ファミリーの遺伝子の発現調節が関与しているかもしれない.

第 2 章では, 果実発達における SIDELLA 依存的な GA シグナル経路の発現調節機構の一端を明らかにするため, SIDELLA の新規相互作用因子の単離を試みた. その結果, 本研究で以下の点を明らかにした. (1) SIDELLA は 3 つの GA 受容体 SIGID1 と GA 非依存的および依存的に相互作用する (図 2-7). (2) シロイヌナズナやイネなどの既報の他植物とは異なり, トマトでは GID1ac タイプのメンバーも GA 非依存的な相互作用をする (図 2-7), (3) CANDIDATE OF DELLA INTERACTOR 3 (CDI3), CDI5, CDI7 は SIDELLA と物理的に相互作用する (図 2-14, 15, 16).

初めに, DELLA の 26S プロテアソーム系を介した分解の誘導に重要な SIDELLA タンパク質と GA 受容体 SIGID1 との相互作用を明らかにすること, 及びタンパク間相互作用の実験系を確立することを目的に, トマトにおける GA 受容体の選抜と SIDELLA との相互作用実験を実施した. その結果, トマトの SIDELLA と 3 つの SIGID1 の GA 非存在下及び GA 存在下での相互作用を明らかにした (図 2-7, 8). GID1ac ファミリーのメンバーが GA 非依存的に DELLA と相互作用したが, これは他の植物でも報告されていない現象で GA 受容体 GID1 遺伝子の進化を考える上でユニークな発見と考えられた. また, 3 つの SIGID1 のうち, 果実発達においては *SIGID1b-1* および *SIGID1b-2* の遺伝子発現が高いため (図 2-3), 果実中の SIDELLA の分解にはこの 2 つの遺伝子が主要な役割をすると推測された.

次に, 確立した Yeast two hybrid (Y2H) 法を用いて SIDELLA の相互作用因子を 3 遺伝子 (CDI3, CDI5, CDI7) 単離した. いずれも他の植物でも DELLA との相互作用が報告されていない遺伝子であった (図 2-14, 15, 16).

第 3 章では CDI5 の機能解析を行った.

摘要

本研究ではジベレリン (GA) シグナルのマスター因子である DELLA タンパク質に制御される GA シグナルの果実発達における役割の解明に取り組んだ (なお, 本論文では“果実発達”は, 果実形成 (着果) から果実肥大そして果実成熟に至るまでの過程と定義した). トマトは *DELLA* 遺伝子 (*SIDELLA/PROCERA*) を 1 つ持ち, *procera* (*pro*) 変異体など *SIDELLA* が機能欠損することで恒常的な GA 応答が引き起こされる. *pro* 変異体は植物体の徒長という典型的な GA 応答表現型に加えて, 単為結果性と果実の着色遅延という特徴的な果実形質を示す. これは *SIDELLA* を介した GA シグナルが, 果実発達の初期のみならず後期も重要な役割を持つことを示唆する. しかし, 現在までに *SIDELLA* の果実発達における具体的な作用メカニズムは明らかにされてきていない. その要因として, *SIDELLA* の下流遺伝子や, その発現制御に直接関与する *SIDELLA* 相互作用因子 (*DELLA-INTERACTING PROTEINS*, *DIPs*) についての知見が不足していることが考えられた. そこで, 本研究では, (1) トマト果実発達における組織特異的な GA シグナル経路を明らかにすること, (2) トマト果実発達における GA シグナルへ関与する新規 *DIPs* を単離すること, (3) トマト果実発達における新規 *DIPs* の機能を明らかにすること, 並びに (4) *SIDELLA* と新規 *DIPs* の相互作用の果実発達における役割を解明することを目的とした.

第 1 章では, *SIDELLA* の果実発達における役割を明らかにするため, 比較的 GA の機能解明研究が進展している着果に着目した. 特に, 筆者が修士課程時に同定した雌蕊特異的発現遺伝子 (*Pistil-specific genes*, *PSGs*) の中で, *pro* 変異体の着果時で特異的な遺伝子変動を示す *PSGs* の探索を行った. その結果, (1) *PSGs* のうち約半数は機能未知遺伝子であること, (2) *PSGs* は胚珠や種子優先的な発現を示すことを明らかにし, (3) 着果に関連した GA シグナルにより抑制的に制御される *PSGs* (*Pistil specific GA responsive genes*, *PS-GRGs*) を単離することができた. *PS-GRGs* には胚珠の発達に関与する転写因子や受精に関与するペプチドホルモン類が含まれ, GA シグナルによって着果に重要な胚珠の発達が制御されることが示唆された.

第 2 章では, 果実発達における *SIDELLA* 依存的な GA シグナル経路の発現調節機構の一端を明らかにするため, *SIDELLA* の新規相互作用因子の単離を試み, (1) *SIDELLA* は GA 受容体 *SIGID1* の GA 非依存的・依存的な相互作用の確認と, (3) *SIDELLA* 新規相互作用因子 (*CDI3*, *CDI5*, *CDI7*) の単離をすることができた.

謝辞

本研究を行うにあたって、多くの方々にお世話になりました。Duke University の Tai-ping Sun 教授には Yeast two hybrid 系構築の為のベクターのご分与、及び実験手法の習得のための滞在機会を提供して頂き大変お世話になりました。また、東京大学の鈴木研究室の方々には RNA-sequencing を実施していただきました。この場を借りて、感謝申し上げます。

このような素晴らしい研究の場を与えていただき、本研究の遂行および本博士論文の取りまとめにあたり、研究の方針から手法に至るまでご助言を賜りました筑波大学生命環境系准教授 有泉亨博士、同大学同系教授 江面浩博士に心より感謝申し上げます。同じく本研究の遂行にあたり、同大学同系助教 星川健博士、同大学同系助教 岡部佳弘博士、同大学同系博士研究員 篠崎良仁博士、またその他諸先生方及び博士研究員の方々には、学部時代より実験手法や研究内容について議論をする時間をとっていただきました。この場を借りて、感謝申し上げます。また、本論文作成にあたりご閲覧の労を賜りました同大学同系教授 三浦謙治博士、同大学同系教授 草野都博士、同大学同系助教授 矢野亮一博士に感謝申し上げます。

蔬菜花卉学研究室の皆様や同研究室卒業生の皆様には研究面ばかりでなく日常生活の面も含めていろいろとお世話になりました。この場を借りて、感謝申し上げます。

経済面では独立行政法人日本学術振興会より研究奨励金として生活に必要な金銭面の援助を、また研究資金として科学研究費補助金を交付していただきました。深く感謝申し上げます。

最後に、これまで支えてくれた友人達、家族に最大の感謝と敬意を表します。

参考文献

Abad M, Monterio AA. (1989). The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: A review. *Sci Hortic.* **38**: 167-192.

Abe A, Kosugi S, Yoshida K, Natsume S, Takagi H, Kanzaki H, et al. (2012). Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat Biotechnol.* **30**: 174-178.

Achard P, Cheng H, De Grauwe L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91-94.

Achard P, Liao L, Jiang C, Desnos T, Bartlett J, et al. (2007). DELLAs contribute to plant photomorphogenesis. *Plant Physiol.* **143**: 1163-1172.

Achard P, Gong F, Cheminant S, Alioua M, Hedden P, Genschik P. (2008a). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *Plant Cell* **20**: 2117-2129.

Achard P, Renou JP, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P. (2008b). Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Curr. Biol.* **18**: 656-660.

Achard P, Genschik P. (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J Exp Bot.* **60**: 1085-1092.

Alvarez J, Smyth DR. (1999). CRABS CLAW and SPATULA, two *Arabidopsis* genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. *Development* **126**: 2377-2386.

An F, Zhao Q, Ji Y, Li W, Jiang Z, Yu X, et al. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 2384-2401.

An F, Zhang X, Zhu Z, Ji Y, He W, Jiang Z, et al. (2012). Coordinated regulation of apical hook development by gibberellins and ethylene in etiolated *Arabidopsis* seedlings. *Cell Res.* **22**: 915-927.

Appelhagen I, Lu GH, Huel G, Schmelzer E, Weisshaar B, Sagasser M. (2011). TRANSPARENT TESTA1 interacts with R2R3-MYB factors and affects early and late steps of flavonoid biosynthesis in the endothelium of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant J.* **67**: 406-419.

Arabidopsis Interactome Mapping Consortium. (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science* **333**: 601-607.

Ariizumi T, Murase K, Sun TP, Steber CM. (2008). Proteolysis-independent downregulation of DELLA repression in *Arabidopsis* by the gibberellin receptor GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1. *Plant Cell* **20**: 2447-2459.

Ariizumi T, Shinozaki Y, Ezura H. (2013). Genes that influence yield in tomato. *Breed Sci.* **63**: 3-13.

Ariizumi T, Kishimoto S, Kakami R, Maoka T, Hirakawa H, Suzuki Y, et al. (2014). Identification of the carotenoid modifying gene *PALE YELLOW PETAL 1* as an essential factor in xanthophyll esterification and yellow flower pigmentation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant J.* **79**: 453-465.

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, et al. (2012a). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol.* **14**:

810-817.

Bai MY, Fan M, Oh E, Wang ZY. (2012b). A triple helix-loop-helix/basic helix-loop-helix cascade controls cell elongation downstream of multiple hormonal and environmental signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4917-4929.

Balasubramanian S, Schneitz K. (2000). NOZZLE regulates proximal-distal pattern formation, cell proliferation and early sporogenesis during ovule development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **127**: 4227-4238.

Bassel GW, Mullen RT, Bewley JD. (2008). Procera is a putative DELLA mutant in tomato (*Solanum lycopersicum*): effects on the seed and vegetative plant. *J Exp Bot.* **59**: 585-593.

Binder BM, Rodríguez FI, Bleecker AB. (2010). The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* **285**: 37263-37270.

Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F. (2012). Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS One* **7**, e48198.

Bohner J, Hedden P, Bora-Haber E, Bangerth F. (1988). Identification and quantitation of gibberellins in fruits of *Lycopersicon esculentum*, and their relationship to fruit size in *L. esculentum* and *L. pimpinellifolium*. *Physiol Plant.* **73**: 348-353.

Boss PK, Thomas MR. (2002). Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation. *Nature* **416**: 847-850.

Bubici G, Carluccio AV, Stavolone L, Cillo F. (2017). Prosystemin overexpression induces transcriptional modifications of defense-related and receptor-like kinase genes and reduces the susceptibility to Cucumber mosaic virus and its satellite RNAs in transgenic tomato plants. *PLoS*

One **12**: e0171902.

Calderón Villalobos LI, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, et al. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol.* **8**: 477-485.

Carbonell-Bejerano P, Urbez C, Carbonell J, Granell A, Perez-Amador MA. (2010). A fertilization-independent developmental program triggers partial fruit development and senescence processes in pistils of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **154**: 163-172.

Carrera E, Ruiz-Rivero O, Peres LE, Atares A, Garcia-Martinez JL. (2012). Characterization of the procera tomato mutant shows novel functions of the SIDEELLA protein in the control of flower morphology, cell division and expansion, and the auxin-signaling pathway during fruit-set and development. *Plant Physiol.* **160**: 1581-1596.

Caufield JH, Sakhawalkar N, Uetz P. (2012). A comparison and optimization of yeast two-hybrid systems. *Methods* **58**: 317-324.

Chakrabarti M, Zhang N, Sauvage C, Muñoz S, Blanca J, Cañizares J, et al. (2013). A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**: 17125-17130.

Chandler PM, Marion-Poll A, Ellis M, Gubler F. (2002). Mutants at the *Slender1* locus of barley cv Himalaya: molecular and physiological characterization. *Plant Physiol.* **129**: 181-190.

Chen G, Alexander L, Grierson D. (2004b). Constitutive expression of EIL-like transcription factor partially restores ripening in the ethylene-insensitive *Nr* tomato mutant. *J Exp Bot.* **55**: 1491-1497.

Chen R, Binder BM, Garrett WM, Tucker ML, Chang C, Cooper B. (2011). Proteomic

responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings treated with ethylene. *Mol Biosyst.* **7**: 2637-2650.

Chen W, Kong J, Lai T, Manning K, Wu C, Wang Y, et al. (2015a). Tuning LeSPL-CNR expression by SlymiR157 affects tomato fruit ripening. *Sci Rep.* **5**: 7852.

Chen W, Kong J, Qin C, Yu S, Tan J, Chen YR, et al. (2015b). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for somatic inheritance of the spontaneous tomato epimutation *Colourless non-ripening*. *Sci Rep.* **5**: 9192.

Chen S, Wang X, Zhang L, Liu D, Wang Q, Cai S, et al. (2016a). Identification and characterization of tomato *gibberellin 2-oxidases (GA2oxs)* and effects of fruit-specific *SIGA2ox1* overexpression on fruit and seed growth and development. *Hortic Res.* **3**: 16059.

Chen L, Zhang L, Yu D. (2017). Transcription factor WRKY75 interacts with DELLA proteins to affect flowering. *Plant Physiol.* **176**: 790-803.

Chini A, Fonseca S, Fernández G, Adie B, Chico JM, Lorenzo O, et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**: 666-671.

Claeys H, Skirycz A, Maleux K, Inzé D. (2012). DELLA signaling mediates stress-induced cell differentiation in *Arabidopsis* leaves through modulation of anaphase-promoting complex/cyclosome activity. *Plant Physiol.* **159**: 739-747.

Cong B, Tanksley SD. (2006). FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Mol Biol.* **62**: 867-880.

Conti L, Price G, O'Donnell E, Schwessinger B, Dominy P, Sadanandom A. (2008). Small ubiquitin-like modifier proteases OVERLY TOLERANT TO SALT1 and -2 regulate salt stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2894-2908.

Conti L, Nelis S, Zhang C, Woodcock A, Swarup R, Galbiati M, et al. (2014). Small ubiquitin-like modifier protein SUMO enables plants to control growth independently of the phytohormone gibberellin. *Dev Cell.* **28**: 102-110.

Dai C, Xue HW. (2010). Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J.* **29**: 1916-1927.

Daher FB, Braybrook SA. (2015). How to let go: pectin and plant cell adhesion. *Front Plant Sci.* **6**: 523.

de Jong M, Wolters-Arts M, Feron R, Mariani C, Vriezen WH. (2007). The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *Plant J.* **57**: 160-170.

de Jong M, Mariani C, Vriezen WH. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot.* **60**: 1523-1532.

de Lucas M, Davière JM, Rodríguez-Falcón M, Pontin M, Iglesias-Pedraz JM, Lorrain S, et al. (2008). A molecular framework for light and gibberellin control of cell elongation. *Nature* **451**: 480-484.

Derkx MPM, Vermeer E, Karssen CM. (1994). Gibberellins in seeds of *Arabidopsis thaliana*: biological activities, identification and effects of light and chilling on endogenous levels. *Plant Growth Regul.* **15**: 223-234.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.

Ding W, Tong H, Zheng W, Ye J1, Pan Z, Zhang B, et al. (2017). Isolation, characterization and transcriptome analysis of a cytokinin receptor mutant *Osc1* in Rice. *Front Plant Sci.* **8**: 88.

Dobritzsch S, Weyhe M, Schubert R, Dindas J, Hause G, Kopka J, et al. (2015). Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses. *BMC Biol.* **13**: 28.

Dong CH, Rivarola M, Resnick JS, Maggin BD, Chang C. (2008). Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *Plant J.* **53**: 275-286.

Dong CH, Jang M, Scharein B, Malach A, Rivarola M, Liesch J, et al. (2010). Molecular association of the *Arabidopsis* ETR1 ethylene receptor and a regulator of ethylene signaling, RTE1. *J Biol Chem.* **285**: 40706-40713.

Dostal HC, Leopold AC. (1967). Gibberellin delays ripening of tomatoes. *Science* **158**: 1579-1580.

Dünkler A, Müller J, Johnsson N. (2012). Detecting protein-protein interactions with the Split-Ubiquitin sensor. *Methods Mol Biol.* **786**: 115-130.

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.

江面健太郎. (2015). 単為結果機構解明に向けた分子育種素材の作出：トマト雌ずい特異的遺伝子の選抜と評価. 筑波大学 H.27 修士学位論文.

Ezura K, Ji-Seong K, Mori K, Suzuki Y, Kuhara S, Ariizumi T, et al. (2017). Genome-wide identification of pistil-specific genes expressed during fruit set initiation in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS One* **12**: e0180003.

Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, et al. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**: 475-479.

Figueiredo DD, Batista RA, Roszak PJ, Köhler C. (2015). Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nat Plants* **1**: 15184.

Figueiredo DD, Batista RA, Roszak PJ, Hennig L, Köhler C. (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *eLife* **5**: e20542.

Fos M, Nuez F, García-Martínez JL. (2000). The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.* **122**: 471-480.

Fos M, Proaño K, Nuez F, García-Martínez JL. (2001). Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plant.* **111**: 545-550.

Franco-Zorrilla JM, López-Vidriero I, Carrasco JL, Godoy M, Vera P, Solano R. (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **111**: 2367-2372.

Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, et al. (2000). *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88.

Fu YY. (2013). Characterization of Tomato SIARF family and SIARF8A variants reveals a selective transcriptional control of ARF8 by alternative splicing and miRNA stress in auxin mediated fruit set. University of Touroise. Doctor thesis.

藤村良, 北野辰行, 森俊人, 伊藤純吉. (1962). トマトの奇形果に関する研究 (第 1 報) ホルモン濃度, ホルモン処理時期および高温の影響. 兵庫農試研報. **10**: 63-64.

Fujii H, Chinnusamy V, Rodrigues A, Rubio S, Antoni R, et al. (2009). In vitro reconstitution of an abscisic acid signaling pathway. *Nature* **462**: 660-664.

Fukazawa J, Teramura H, Murakoshi S, Nasuno K, Nishida N, Ito T, et al. (2014). DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2920-2938.

Fukazawa J, Mori M, Watanabe S, Miyamoto C, Ito T, Takahashi Y. (2017). DELLA-GAF1 complex is a main component in gibberellin feedback regulation of *GA20 Oxidase 2*. *Plant Physiol.* **175**: 1395-1406.

Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S, et al. (2004). *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 6803-6808.

Gasch P, Fundinger M, Müller JT, Lee T, Bailey-Serres J, Mustroph A. (2016). Redundant ERF-VII transcription factors bind to an evolutionarily conserved *cis*-motif to regulate hypoxia-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **28**:160-180.

Gerke V, Moss SE. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* **82**: 331-371.

Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W. (1993). Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.

Gomez MD, Ventimilla D, Sacristan R, Perez-Amador MA. (2016). Gibberellins regulate ovule integument development by interfering with the transcription factor ATS. *Plant Physiol.* **172**: 2403-2415.

Gorguet B, Eggink PM, Ocaña J, Tiwari A, Schipper D, Finkers R, et al. (2008). Mapping and characterization of novel parthenocarp QTLs in tomato. *Theor Appl Genet.* **116**: 755-767.

Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. (2001). Auxin regulates SCF TIR1-dependent degradation of Aux/IAA proteins. *Nature* **414**: 271-276.

Griffiths J, Murase K, Rieu I, Zentella R, Zhang ZL, Powers SJ, et al. (2006). Genetic characterization and functional analysis of the GID1 gibberellin receptors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3399-3414.

Gubler F, Chandler P, White R, Llewellyn D, Jacobsen J. (2002). GA signaling in barley aleurone cells: control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* **129**: 191-200.

Guo H, Ecker JR. (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF^(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**: 667-677.

Hanover JA, Krause MW, Love DC. (2010). The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta.* **1800**: 80-95.

Hao GF, Yang SG, Yang GF, Zhan CG. (2013). Computational gibberellin-binding channel discovery unraveling the unexpected perception mechanism of hormone signal by gibberellin receptor. *J Comput Chem.* **34**: 2055-2064.

Hauvermale AL, Ariizumi T, Steber CM. (2012). Gibberellin signaling: a theme and variations on DELLA repression. *Plant Physiol.* **160**: 83-92.

Hedden P, Thomas SG. (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem J.* **444**: 11-25.

Hehenberger E, Kradolfer D, Köhler C. (2012). Endosperm cellularization defines an

important developmental transition for embryo development. *Development* **139**: 2031-2039.

Hirakawa H, Shirasawa K, Miyatake K, Nunome T, Negoro S, Ohyama A, et al. (2014). Draft genome sequence of eggplant (*Solanum melongena* L.): the representative *Solanum* species indigenous to the old world. *DNA Res.* **21**: 649-660.

Hirayama T, Kieber JJ, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, et al. (1999). RESPONSIVE-TOANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **97**: 383-393.

Hökfelt T. (1991). Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron* **7**: 867-879.

Hong GJ, Xue XY, Mao YB, Wang LJ, Chen XY. (2012). *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression. *Plant Cell* **24**: 2635-2648.

Hou X, Lee LY, Xia K, Yan Y, Yu H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev Cell* **19**: 884-894.

Hou X, Zhou J, Liu C, Liu L, Shen L, Yu H. (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of *Arabidopsis*. *Nat Commun.* **5**: 4601.

Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K. (2004). Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *Plant Cell* **16**: 3437-3447.

Hothorn M, Van den Ende W, Lammens W, Rybin V, Scheffzek K. (2010). Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**: 17427-17432.

Howe EA, Sinha R, Schlauch D, Quackenbush J. (2011). RNA-Seq analysis in MeV. *Bioinformatics* **27**: 3209-3210.

Huang D, Wang S, Zhang B, Shang-Guan K, Shi Y, Zhang D, et al. (2015). A gibberellin-mediated DELLA-NAC signaling cascade regulates cellulose synthesis in Rice. *Plant Cell* **27**: 1681-1696.

Huot B, Yao J, Montgomery BL, He SY. (2014). Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. *Mol Plant* **7**: 1267-1287.

Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, Ashikari M, Matsuoka M. (2002). The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell* **14**: 57-70.

Jarvis P, López-Juez E. (2013). Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **14**: 787-802.

Jasinski S, Tattersall A, Piazza P, Hay A, Martinez-Garcia JF, Schmitz G. et al. (2008). PROCERA encodes a DELLA protein that mediates control of dissected leaf form in tomato. *Plant J.* **56**: 603-612.

Jenkins JA. (1948). The origin of cultivated tomato. *Economic Botany* **2**: 379-392.

Jin Y, Ni DA, Ruan YL. (2009). Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *Plant Cell* **21**: 2072-2089.

Jones MG. (1987). Gibberellins and the procera mutant of tomato. *Planta* **172**: 280-284.

Jolie RP, Duvetter T, Van Loey AM, Hendrickx ME. (2010). Pectin methylesterase and its

proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydr Res.* **345**: 2583-2595.

Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, et al. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**: 19486-19491.

Kang IH, Steffen JG, Portereiko MF, Lloyd A, Drews GN. (2008). The AGL62 MADS domain protein regulates cellularization during endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 635-647.

片岡圭子, 伊達修一, 後藤丹十郎, 浅平端. (1994). ホルクロルフエニユロンによるオーキシン誘導単為結果トマト果実の空どう果の発生抑制. *園学雑.* **63**: 61-66.

Kataoka K, Yashiro Y, Habu T, Sunamoto K, Kitajima A. (2009). The addition of gibberellic acid to auxin solutions increases sugar accumulation and sink strength in developing auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Sci Hortic.* **123**: 228-233.

Kataoka, K, Uemachi A, Yazawa S. (2003). Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Sci Hortic.* **98**: 9-16.

Kataoka, K, Uemachi A, Nonaka M, Yazawa S. (2004). Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the 'Severianin' tomato. *J Hort Sci Biotech.* **79**: 54-58.

Kataoka K, Sakakibara T, Nishikawa K, Kusumi K, Yazawa S. (2008). Seed formation is affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in a parthenocarpic cultivar Severianin of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*). *J Japan Soc Hort Sci.* **77**: 283-288.

Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, et al. (2011). Methionine

adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell* **41**: 554-566.

Katsir L, Davies KA, Bergmann DC, Laux T. (2011). Peptide signaling in plant development. *Curr Biol.* **21**: 356-364.

Kauss H, Swanson AL, Hassid WZ. (1967). Biosynthesis of the methyl ester groups of pectin by transmethylation from *S*-adenosyl-L-methionine. *Biochem Biophys Res Commun.* **26**: 234-240.

Kepinski S, Leyser O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446-451.

Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. (2013). Methionine adenosyltransferase II-dependent histone H3K9 methylation at the COX-2 gene locus. *J Biol Chem.* **288**: 13592-13601.

Kim S, Park M, Yeom SI, Kim YM, Lee JM, Lee HA, et al. (2014). Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species. *Nat Genet.* **46**: 270-278.

Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, et al. (2016). Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnol J.* **15**: 634-647.

Kumar R, Tyagi AK, Sharma AK. (2012). Genome-wide analysis of auxin response factor (ARF) gene family from tomato and analysis of their role in flower and fruit development. *Mol Genet Genomics* **285**: 245-260.

Kobayashi M, Nagasaki H, Garcia V, Just D, Bres C, Mauxion JP, et al. (2014). Genome-

wide analysis of intraspecific DNA polymorphism in 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Physiol.* **55**: 445-454.

Kondo S, Kawai M. (1998). Relationship between free and conjugated ABA levels in seeded and gibberellin-treated seedless, maturing 'Pione' grape berries. *J Amer Soc Hort Sci.* **123**: 750-754.

Koshioka M, Nishijima T, Yamazaki H, Nonaka M, Mander LN. (1994). Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *J Horticult Sci.* **69**: 171-179.

Larkin RM, Ruckle ME. (2008). Integration of light and plastid signals. *Curr Opin Plant Biol.* **11**: 593-599.

Lawit SJ, Wych HM, Xu D, Kundu S, Tomes DT. (2010). Maize DELLA proteins dwarf plant8 and dwarf plant9 as modulators of plant development. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1854-1868.

Lee S, Cheng H, King KE, Wang W, He Y, Hussain A, et al. (2002). Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. *Genes Dev.* **16**: 646-658.

Lee S, Lee S, Yang KY, Kim YM, Park SY, Kim SY, et al. (2006). Overexpression of *PRE1* and its homologous genes activates Gibberellin-dependent responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 591-600.

Leivar P, Monte E. (2014). PIFs: systems integrators in plant development. *Plant Cell* **26**: 56-78.

Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* **272**: 398-401.

Li J, Chory J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid

signal transduction. *Cell* **90**: 929-938.

Li J, Li Z, Tang L, Yang Y, Zouine M, Bouzayen M. (2012). A conserved phosphorylation site regulates the transcriptional function of ETHYLENEINSENSITIVE3- like1 in tomato. *J Exp Bot.* **63**: 427-439

Li K, Yu R, Fan LM, Wei N, Chen H, Deng XW. (2016). DELLA-mediated PIF degradation contributes to coordination of light and gibberellin signalling in *Arabidopsis*. *Nat Commun.* **7**: 11868.

Li L, Zhao Y, McCaig BC, Wingerd BA, Wang J, Whalon ME, et al. (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**: 126-143.

Li M, An F, Li W, Ma M, Feng Y, Zhang X, et al. (2016). DELLA proteins interact with FLC to repress flowering transition. *J Integr Plant Biol.* **58**: 642-655.

Li W, Ma M, Feng Y, Li H, Wang Y, Ma Y, et al. (2015). EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* **163**: 670-683.

Li Z, Zhang L, Yu Y, Quan R, Zhang Z, Zhang H, Huang R. (2011). The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor for ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **68**: 88-99.

Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, et al. (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat Genet.* **46**: 1220-1226.

Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, et al. (2007). Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by

Botrytis cinerea. Plant Physiol. **143**: 1871-1880.

Liu L, Shao Z, Zhang M, Wang Q. (2014a). Regulation of carotenoid metabolism in tomato. Mol Plant **8**: 28-39.

Liu L, Wei J, Zhang M, Zhang L, Li C, Wang Q. (2012b). Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. J Exp Bot. **63**: 5751-5761.

Liu M, Diretto G, Pirrello J, Roustan JP, Li Z, Giuliano G, et al. (2014b). The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, SI-ERF.B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. New Phytol. **203**: 206-218.

Liu M, Gomes BL, Mila I, Purgatto E, Peres LE, Frasse P, et al. (2016). Comprehensive profiling of ethylene response factor expression identifies ripening-associated *ERF* genes and their link to key regulators of fruit ripening in tomato. Plant Physiol. **170**: 1732-1744.

Liu M, Pirrello J, Kesari R, Mila I, Roustan JP, Li Z, et al. (2013). A dominant repressor version of the tomato SI-ERF.B3 gene confers ethylene hypersensitivity via feedback regulation of ethylene signaling and response components. Plant J. **76**: 406-419.

Liu Y, Li X, Yu Y, Shi J, Liang Z, Run X, et al. (2012a). Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. PLoS One **7**: e43724.

Livne S, Lor VS, Nir I, Eliaz N, Aharoni A, Olszewski NE, et al. (2015). Uncovering DELLA-independent gibberellin responses by characterizing new tomato *procera* mutants. Plant Cell **27**: 1579-1594.

Locascio A, Blazquez MA, Alabadi D. (2013). Dynamic regulation of cortical microtubule organization through prefoldin–DELLA interaction. Curr Biol. **23**: 804-809.

Lora J, Hormaza JI, Herrero M, Gasser CS. (2011). Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **108**: 5461-5465.

Major IT, Yoshida Y, Campos ML, Kapali G, Xin XF, Sugimoto K et al. (2017). Regulation of growth-defense balance by the JASMONATE ZIM-DOMAIN (JAZ)-MYC transcriptional module. *New Phytol.* **215**: 1533-1547.

Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, et al. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet.* **38**: 948-952.

Mapelli S, Frova C, Torti G, and Soressi GP. (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* **19**: 1281-1288

Maraschin Fdos S, Memelink J, Offringa R. (2009). Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J.* **59**: 100-109.

Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**: 222-226.

Marín-de la Rosa N, Sotillo B1, Miskolczi P, Gibbs DJ, Vicente J, Carbonero P, et al. (2014). Large-scale identification of gibberellin-related transcription factors defines group VII ETHYLENE RESPONSE FACTORS as functional DELLA partners. *Plant Physiol.* **166**: 1022-32.

Marín-de la Rosa N, Pfeiffer A, Hill K, Locascio A, Bhalerao RP, Miskolczi P, et al. (2015). Genome wide binding site analysis reveals transcriptional coactivation of cytokinin-responsive genes by DELLA proteins. *PLoS Genet.* **11**: e1005337.

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

Martí E, Gisbert C, Bishop GJ, Dixon MS, García-Martínez JL. (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. *J Exp Bot.* **57**: 2037-2047.

Marshall E, Costa LM, Gutierrez-Marcos J. (2011). Cysteine-rich peptides (CRPs) mediate diverse aspects of cell-cell communication in plant reproduction and development. *J Exp Bot.* **62**:1677-1686.

Matsubayashi Y. (2011). Post-translational modifications in secreted peptide hormones in plants. *Plant Cell Physiol.* **52**: 5-13.

McAbee JM, Hill TA, Skinner DJ, Izhaki A, Hauser BA, Meister RJ, et al. (2006). *ABERRANT TESTA SHAPE* encodes a KANADI family member, linking polarity determination to separation and growth of *Arabidopsis* ovule integuments. *Plant J.* **46**: 522-531.

McGinnis KM, Thomas SG, Soule JD, Strader LC, Zale JM, Sun TP, et al. (2003). The *Arabidopsis* SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. *Plant Cell* **15**: 1120-1130.

McGrath KC, Dombrecht B, Manners JM, Schenk PM, Edgar CI, Maclean DJ, et al. (2005). Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of *Arabidopsis* transcription factor gene expression. *Plant Physiol.* **139**: 949-959.

Merchante C, Brumos J, Yun J, Hu Q, Spencer KR, Enríquez P, et al. (2015). Gene-specific translation regulation mediated by the hormone-signaling molecule EIN2. *Cell* **163**: 684-697.

Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, et al. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res.* **45**: 183-189.

Micheli F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends Plant Sci.* **6**: 414-419.

Millán-Zambrano G, Rodríguez-Gil A, Peñate X, de Miguel-Jiménez L, Morillo-Huesca M, Krogan N, et al. (2013). The prefoldin complex regulates chromatin dynamics during transcription elongation. *PLoS Genet.* **9**: e1003776.

Millán-Zambrano G, Chávez S. (2014). Nuclear functions of prefoldin. *Open Biol.* **4**: 140085.

Minges PA, Mann LK. (1949). Improving Tomato Fruit Set: use of hormone spray treatment for improvement of fruit set for spring and early summer harvest. *California Agriculture.* **8**.

Mirabeau O, Perlas E, Severini C, Audero E, Gascuel O, Possenti R, et al. (2007). Identification of novel peptide hormones in the human proteome by hidden Markov model screening. *Genome Res.* **17**: 320-327.

Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. (2008). Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology. *J Biochem.* **143**: 725-729.

Miyoshi E, Moriwaki K, Terao N, Tang CC, Terao M, Nakagawa T. et al. (2012). Fucosylation is a promising target for cancer diagnosis and therapy. *Biomolecules* **2**: 34-45.

Mu Q, Huang Z, Chakrabarti M, Illa-Berenguer E, Liu X, Wang Y, et al. (2017). Fruit weight is controlled by *Cell Size Regulator* encoding a novel protein that is expressed in maturing tomato fruits. *PLoS Genet.* **13**: e1006930.

Mukherjee K, Brocchieri L, Burglin TR. (2009). A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol Biol Evol.* **26**: 2775-2794.

Müller F, Xu J, Kristensen L, Wolters-Arts M, de Groot PF, Jansma SY, et al. (2016). High-temperature-induced defects in tomato (*Solanum lycopersicum*) anther and pollen development are associated with reduced expression of B-Class floral patterning genes. *PLoS One* **11**: e0167614.

Murase K, Hirano Y, Sun TP, Hakoshima T. (2008). Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1. *Nature* **456**: 459-463.

Nagel AK, Ball LE. (2014). O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* **46**: 2305-2316.

Nakajima M, Shimada A, Takashi Y, Kim YC, Park SH, Ueguchi-Tanaka M, et al. (2006). Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *Plant J.* **46**: 880-889.

Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.* **140**: 411-432

Ning J, Peng XB, Qu LH, Xin HP, Yan TT, Sun M. (2006). Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restructured before the first zygotic division in tobacco. *FEBS Lett.* **580**: 1747-1752.

Ogas J, Kaufmann S, Henderson J, Somerville C. (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 13839-1344.

Oh E, Zhu JY, Bai MY, Arenhart RA, Sun Y, Wang ZY. (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *eLife* **3**:

e03031.

Okabe Y, Asamizu E, Saito T, Matsukura C, Ariizumi T, Brès C, et al. (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, Asamizu E, Ariizumi T, Shirasawa K, Tabata S, Ezura H. (2012). Availability of Micro-Tom mutant library combined with TILLING in molecular breeding of tomato fruit shelf-life. *Breed Sci.* **62**: 202-208.

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

Okamoto T, Higuchi K, Shinkawa T, Isobe T, Lörz H, Koshiba T, et al. (2004). Identification of major proteins in maize egg cells. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1406-1412.

Okamoto S, Tabata R, Matsubayashi Y. (2016). Long-distance peptide signaling essential for nutrient homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol.* **34**: 35-40.

Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Mariotti L, Ceccarelli N, Soressi GP, et al. (2007). Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**: 877-888.

Okuda S, Tsutsui H, Shiina K, Sprunck S, Takeuchi H, Yui R, et al. (2009). Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature* **458**: 357-361.

Østerlund T. (2001). Structure-function relationships of hormone-sensitive lipase. *Eur J Biochem.* **268**: 1899-1907.

Osteryoung KW, Pyke KA. (2014). Division and dynamic morphology of plastids. *Annu Rev*

Plant Biol. **65**: 443-472.

Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, et al. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. *Development* **132**: 603-614.

Palmer WM, Ru L, Jin Y, Patrick JW, Ruan YL. (2015). Tomato ovary-to-fruit transition is characterized by a spatial shift of mRNAs for cell wall invertase and its inhibitor with the encoded proteins localized to sieve elements. *Mol Plant*. **8**: 315-328.

Pan Y, Bradley G, Pyke K, Ball G, Lu C, Fray R, et al. (2013). Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol*. **161**: 1476-1485.

Park J, Oh DH, Dassanayake M, Nguyen KT, Ogas J, Choi G, et al. (2017). Gibberellin signaling requires chromatin remodeler PICKLE to promote vegetative growth and phase transitions. *Plant Physiol*. **173**: 1463-1474.

Pattison RJ, Csukasi F, Zheng Y, Fei Z, van der Knaap E, Catalá C. (2015). Comprehensive tissue-specific transcriptome analysis reveals distinct regulatory programs during early tomato fruit development. *Plant Physiol*. **168**: 1684-1701.

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA. (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-897.

Pearce G, Ryan CA. (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J Biol Chem*. **278**: 30044-30050.

Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. (2007). New insights into pectin methylesterase

structure and function. *Trends Plant Sci.* **12**: 267-277.

Peng J, Carol P, Richards DE, King KE, Cowling RJ, Murphy GP, et al. (1997). The *Arabidopsis GAI* gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* **11**: 3194-3205.

Peng J, Richards DE, Hartley NM, Murphy GP, Devos KM, Flintham JE, et al. (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* **400**: 256-261.

Pesaresi P, Mizzotti C, Colombo M, Masiero S. (2014). Genetic regulation and structural changes during tomato fruit development and ripening. *Front Plant Sci.* **5**: 124.

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

Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L. (2008). The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* **20**: 2729-2745.

Potuschak T, Vansiri A, Binder BM, Lechner E, Vierstra RD, Genschik P. (2006). The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3047-3057.

Pressman E, Peet MM, Pharr DM. (2002). The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann Bot.* **90**: 631-636.

Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker JR. (2009). Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **23**: 512-521.

Qiao H, Shen Z, Huang SS, Schmitz RJ, Urich MA, Briggs SP, et al. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* **338**: 390-393.

Qin Q, Wang W, Guo X, Yue J, Huang Y, Xu X, et al. (2014). *Arabidopsis* DELLA protein degradation is controlled by a type-one protein phosphatase, TOPP4. *PLoS Genet.* **10**: e1004464.

Qiu K, Li Z, Yang Z, Chen J, Wu S, Zhu X, et al. (2015). EIN3 and ORE1 accelerate degreening during ethylene-mediated leaf senescence by directly activating chlorophyll catabolic genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* **11**: e1005399.

Rajagopala SV, Hughes KT, Uetz P. (2009). Benchmarking yeast two-hybrid systems using the interactions of bacterial motility proteins. *Proteomics* **9**: 5296-5302.

Resnick JS, Rivarola M, Chang C. (2008). Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **56**: 423-431.

Resnick JS, Wen CK, Shockey JA, Chang C. (2006). REVERSION-TOETHYLENE SENSITIVITY1, a conserved gene that regulates ethylene receptor function in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**: 7917-7922.

Rock CD, Bowlby NR, Hoffmann-Benning S, Zeevaart JA. (1992). The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. has reduced chlorophyll fluorescence yields and reduced thylakoid stacking. *Plant Physiol.* **100**: 1796-1801.

Rodríguez-Leal D, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB. (2017). Engineering quantitative trait variation for crop improvement by genome editing. *Cell* **171**: 470-480.

Ruiu F, Picarella ME, Imanishi S, Mazzucato A. (2015). A transcriptomic approach to identify

regulatory genes involved in fruit set of wild-type and parthenocarpic tomato genotypes. *Plant Mol Biol.* **89**: 263-78.

Ryan CA, Pearce G. (1998). Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **14**: 1-17.

Ryan CA, Pearce G. (2001). Polypeptide hormones. *Plant Physiol.* **125**: 65-68.

Sagasser M, Lu GH, Hahlbrock K, Weisshaar B. (2002). *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger proteins. *Genes Dev.* **16**: 138-149.

Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa-Tanase K, Fukuda N, et al. (2011). TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant Cell Physiol.* **52**: 283-296.

Sato S, Peet MM, Thomas JF. (2000). Physiological factors limit fruit set of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under chronic, mild heat stress. *Plant Cell Environ.* **23**: 719-726.

Scharein B, Groth G. (2011). Phosphorylation alters the interaction of the *Arabidopsis* phosphotransfer protein AHP1 with its sensor kinase ETR1. *PLoS One* **6**: e24173.

Scharein B, Voet-van-Vormizeele J, Harter K, Groth G. (2008). Ethylene signaling: identification of a putative ETR1-AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Anal Biochem.* **377**: 72-76.

Scott JW, Harbaugh BK. (1989). Micro-Tom A miniature dwarf tomato. *Florida Agr Expt Sta Circ.* **370**: 1-6.

Serrani JC, Sanjuán R, Ruiz-Rivero O, Fos M, García-Martínez JL. (2007). Gibberellin

regulation of fruit set and growth in tomato. *Plant Physiol.* **145**: 246-257.

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.

Shimada A, Ueguchi-Tanaka M, Nakatsu T, Nakajima M, Naoe Y, Ohmiya H, et al. (2008). Structural basis for gibberellin recognition by its receptor GID1. *Nature* **456**: 520-523.

Silverstone AL, Mak PYA, Casamitjana Martínez E, Sun TP. (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **146**: 1087-1099.

Silverstone AL, Ciampaglio CN, Sun TP. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell.* **10**: 155-169.

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

Snider J, Kittanakom S, Damjanovic D, Curak J, Wong V, Stagljar I. (2010). Detecting interactions with membrane proteins using a membrane two-hybrid assay in yeast. *Nat Protoc.* **5**: 1281-1293.

Sprunck S, Rademacher S, Vogler F, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Dresselhaus T. (2012). Egg cell-secreted EC1 triggers sperm cell activation during double fertilization. *Science* **338**: 1093-1097.

角 利昭, 浜地文雄. (1973). ブドウ(巨峰)の品質向上に関する研究. 第 2 報. ジベレリ

ン処理が着粒増加ならびに無核化に及ぼす影響. 九州農業研究. **35**: 194-195.

Sun TP. (2011a). The molecular mechanism and evolution of the GA-GID1-DELLA signaling module in plants. *Curr Biol.* **21**: 338-345.

Sun JQ, Jiang HL, Li CY. (2011b). Systemin/Jasmonate-mediated systemic defense signaling in tomato. *Mol Plant* **4**: 607-615.

Tabata R, Sumida K, Yoshii T, Ohyama K, Shinohara H, Matsubayashi Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* **346**: 343-346.

Talón M, Koornneef M, Zeevaart JA. (1990). Endogenous gibberellins in *Arabidopsis thaliana* and possible steps blocked in the biosynthetic pathways of the semidwarf *ga4* and *ga5* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **87**: 7983-7987.

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

Tavormina P, De Coninck B, Nikonorova N, De Smet I, Cammue BP. (2015). The plant ptpidome: an expanding repertoire of structural features and biological functions. *Plant Cell* **27**: 2095-2118.

The Potato Genome Sequencing Consortium. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**: 189-195.

Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, et al. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF^(CO11) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665.

Tieman DM, Ciardi JA, Taylor MG, Klee HJ. (2001). Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant J.* **26**: 47-58.

Tiwari SB, Wang WJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. (2001). Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* **13**: 2809-2822.

Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **15**: 533-543.

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

Tu CF, Wu MY, Lin YC, Kannagi R, Yang RB. (2017). FUT8 promotes breast cancer cell invasiveness by remodeling TGF- β receptor core fucosylation. *Breast Cancer Res.* **19**: 111.

Tyler L, Thomas SG, Hu J, Dill A, Alonso JM, Ecker JR, et al. (2004). DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **135**: 1008-1019.

Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, et al. (2005). *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature.* **437**: 693-698.

Ueguchi-Tanaka M, Nakajima M, Motoyuki A, Matsuoka M. (2007). Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **58**: 183-198.

Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ. (1999). Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 5844-5849.

van der Knaap E, Chakrabarti M, Chu YH, Clevenger JP, Illa-Berenguer E, Huang Z, et al. (2014). What lies beyond the eye: the molecular mechanisms regulating tomato fruit weight and shape. *Front Plant Sci.* **5**: 227-240.

Vannier MP, Thoiron B, Morvan C, Demarty M. (1992). Localization of methyltransferase activities throughout the endomembrane system of flax (*Linum usitatissimum* L) hypocotyls. *Biochem J.* **286**: 863-868.

Varbanova M, Yamaguchi S, Yang Y, McKelvey K, Hanada A, Borochoy R, et al. (2007). Methylation of gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32-45.

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.

von Wirén N, Bennett MJ. (2016). Crosstalk between gibberellin signaling and iron uptake in plants: An Achilles' heel for modern cereal varieties? *Dev Cell* **37**: 190-200.

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

Voegelé A, Linkies A, Müller K, Leubner-Metzger G. (2011). Members of the gibberellin receptor gene family *GID1* (*GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1*) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J Exp Bot.* **62**: 5131-5147.

Wang F, Deng XW. (2011). Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. *Cell Res.* **21**: 1286-1294.

Wang Y, Deng D. (2014). Molecular basis and evolutionary pattern of GA-GID1-DELLA

regulatory module. *Mol Genet Genomics*. **289**: 1-9.

Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, et al. (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, et al. (2009a). Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell* **21**: 1428-1452

Wang F, Zhu D, Huang X, Li S, Gong Y, Yao Q, et al. (2009b). Biochemical insights on degradation of *Arabidopsis* DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *Plant Cell* **21**: 2378-2390.

Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY. (2012). Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet*. **46**: 701-724

Wasternack C, Hause B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*. **111**: 1021-1058.

Wen CK, Chang C. (2001). *Arabidopsis* *RGL1* encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell* **14**: 87-100.

Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, et al. (2012). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res*. **22**: 1613-1616.

Weng L, Zhao F, Li R, Xu C, Chen K, Xiao H. (2015). The zinc finger transcription factor SlZFP2 negatively regulates abscisic acid biosynthesis and fruit ripening in tomato. *Plant Physiol*. **167**: 931-949.

Wild M, Davière JM, Regnault T, Sakvarelidze-Achard L, Carrera E, Lopez Diaz I, et al. (2016). Tissue-specific regulation of gibberellin signaling fine-tunes *Arabidopsis* iron-deficiency responses. *Dev Cell* **37**: 190-200.

Woeste KE, Kieber JJ. (2000). A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* **12**: 443-455

Worley CK, Zenser N, Ramos J, Rouse D, Leyser O, Theologis A, et al. (2000). Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J.* **21**: 553-562.

Xiao W, Custard KD, Brown RC, Lemmon BE, Harada JJ, Goldberg RB, et al. (2006). DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* **18**: 805-814.

Xu C, Liberatore KL, MacAlister CA, Huang Z, Chu YH, Jiang K, et al. (2015). A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato. *Nat Genet.* **47**: 784-792.

Xu F, Li T, Xu PB, Li L, Du SS, Lian HL, et al. (2016). DELLA proteins physically interact with CONSTANS to regulate flowering under long days in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **590**: 541-549.

Yamaguchi YL, Ishida T, Sawa S. (2016). CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *J Exp Bot.* **67**: 4813-4826.

Yamamoto Y, Hirai T, Yamamoto E, Kawamura M, Sato T, Kitano H, et al. (2010). A rice *gid1* suppressor mutant reveals that gibberellin is not always required for interaction between its receptor, GID1, and DELLA proteins. *Plant Cell* **22**: 3589-3602.

Yan Y, Stolz S, Chételat A, Reymond P, Pagni M, Dubugnon L, et al. (2007). A downstream

mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**: 2470-2483.

Yang DL, Yao J, Mei CS, Tong XH, Zeng LJ, Li Q, et al. (2012). Plant hormone jasmonate prioritizes defense over growth by interfering with gibberellin signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**: 1192-1200.

Yao Y, Chen X, Wu AM. (2017). ERF-VII members exhibit synergistic and separate roles in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* **12**: e1329073.

Ye J, Wang X, Hu T, Zhang F, Wang B, Li C, et al. (2017). An InDel in the promoter of *Al-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER9* selected during tomato domestication determines fruit malate contents and aluminum tolerance. *Plant Cell* **29**: 2249-2268.

Yoshida H, Hirano K, Sato T, Mitsuda N, Nomoto M, Maeo K, et al. (2014). DELLA protein functions as a transcriptional activator through the DNA binding of the indeterminate domain family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **111**: 7861-7866.

Yoshida Y, Mogi Y, TerBush AD, Osteryoung KW. (2016). Chloroplast FtsZ assembles into a contractile ring via tubulin-like heteropolymerization. *Nat Plants* **2**: 16095.

Yu S, Galvão VC, Zhang YC, Horrer D, Zhang TQ, Hao YH, et al. (2012). Gibberellin regulates the *Arabidopsis* floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA promoter binding-like transcription factors. *Plant Cell* **24**: 3320-3332.

Zentella R, Hu J, Hsieh WP, Matsumoto PA, Dawdy A, Barnhill B, et al. (2016). O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **30**: 164-176.

Zentella R, Sui N, Barnhill B, Hsieh WP, Hu J, Shabanowitz J, et al. (2017). The *Arabidopsis* O-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor DELLA. *Nat Chem Biol.* **13**:

479-485.

Zhang D, Jing Y, Jiang Z, Lin R. (2014). The Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Integrates Brassinosteroid and Gibberellin Signaling during Skotomorphogenic Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 2472-2485.

Zhang F, Qi B, Wang L, Zhao B, Rode S, Riggan ND, et al. (2016). EIN2-dependent regulation of acetylation of histone H3K14 and non-canonical histone H3K23 in ethylene signalling. *Nat Commun.* **7**: 13018.

Zhang H, Bishop B, Ringenberg W, Muir WM, Ogas J. (2012). The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol.* **159**: 418-32.

Zhang S, Xu M, Qiu Z, Wang K, Du Y, Gu L, et al. (2016). Spatiotemporal transcriptome provides insights into early fruit development of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Sci Rep.* **6**: 23173.

Zhang F, Wang L, Qi B, Zhao B, Ko EE, Riggan ND, et al. (2017). EIN2 mediates direct regulation of histone acetylation in the ethylene response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**: 10274-10279.

Zhou X, Zhang ZL, Park J, Tyler L, Jikumaru Y, Qiu K, et al. (2016). The ERF11 transcription factor promotes internode elongation by activating gibberellin biosynthesis and signaling. *Plant Physiol.* **171**: 2760-2770.

Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **53**: 247-273.

Zhu Z, An F, Feng Y, Li P, Xue L, Mu A, et al. (2011). Derepression of ethylene-stabilized

transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**: 12539-12544.

Zouine M, Fu Y, Chateigner-Boutin AL, Mila I, Frasse P, Wang H, et al. (2014). Characterization of the tomato *ARF* gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing. *PLoS One* **9**: e84203.

Zouine M, Maza E, Djari A, Lauvernier M, Frasse P, Smouni A, et al. (2017). TomExpress, a unified tomato RNA-Seq platform for visualization of expression data, clustering and correlation networks. *Plant J*. **92**: 727-735.