

## 総 説

## 花の大型化 — その分子機構とサイトカイニン —

花き研究領域 西島 隆明

(平成 24 年 5 月 29 日受付 平成 24 年 8 月 1 日受理)

## はじめに

大きな花は、それを見る人間に対して強い印象を与え、観賞性が高い。そのため、多くの園芸用花きには、その起源となった野生種より花がはるかに大型化した品種が存在する。わが国で切り花生産額が上位 5 位を占めるキク、バラ、ユリ、カーネーション、トルコギキョウ（農林水産省、2011）に加えて、それぞれ夏季および冬季の花壇用花きとして最も生産額の多いペチュニアおよびパンジーでは、いずれも花径 8 cm 以上の品種が存在している。視点を逆にすれば、大輪形質を獲得した品目が主要品目になり、高い経済的価値を獲得していることになる。

このように重要な形質であるにもかかわらず、花の大型化の育種には非常に長い時間がかかるのが普通である。これは、花の大型化の突然変異の発生率がきわめて低いことによる（西島、2007）。例えば、キクでは、最も古い栽培の記録が紀元前 2 世紀頃であるのに対して、現代の大輪品種と同程度の花の大きさを持つ系統が生まれたのは 18 世紀であり（柴田、1995；柴田、私信）、カーネーションでは、最も古い栽培の記録が 10 世紀頃であるのに対して、現代の大輪品種と同程度の花の大きさを持つ系統が生まれたのは 20 世紀中頃である（武田、1996；小野崎、私信）。つまり、現代品種と同程度の花の大きさを獲得するのに、キクでは約 2000 年、カーネーションでは約 1000 年かかったことになる。現在では、放射線照射、化学変異原処理、倍数体化、そして、胚培養等による交雑組み合わせの拡大など、様々な人工的変異誘発法があるため、花の大型化の育種に、このような 1000 年単位の時間はかからないと思われる。しかし、約 50 年前に本格的な栽培と育種が始まり、現代的な育

種法が適用されてきたトルコギキョウにおいて（八代、1994）、花の大型化が現在も進行中であることを考えれば、花の大型化が飽和レベルに達するには、数十年から数百年の年月がかかると考えてよいであろう。このように、花の大型化の変異は発生しにくいいため、大輪形質を獲得している花きは、あくまで人間の視点からの意見ではあるが、「幸運な少数の」花きであると考えられる。花き類、そして野生植物には、むしろそのような「幸運」に恵まれなかったものの方が圧倒的に多数派である。しかし、これらの植物にも、魅力的な姿や色の花を咲かせるものは多い。もし、これらの植物の花の特長を活かしつつ、計画的な大輪化によって人間に与える印象を強くする方法が明らかになれば、観賞性の高い新たな品目を作り出すことができ、花き園芸の世界をより豊かにすることができるであろう。そのためには、花の大型化の分子機構を明らかにし、分子レベルで育種法をデザインすることが必要である。

これまで、花の大型化の分子機構に関する研究は遅れていたが、近年のシロイヌナズナをはじめとするモデル植物における研究により、ようやくその解明の入り口に到達した状態であるといえよう。それらの研究は、花の大型化に植物ホルモンが関与する例が少なくないことを示している。本総説では、花の大型化の分子機構解明の現状を、モデル植物における研究を中心に概観した上で、筆者らが研究対象としているペチュニアの花の大型化の分子機構に関する研究を紹介する。さらに、これらの研究結果に基づき、花の大型化の育種を計画的に行うことができる可能性について検討する。

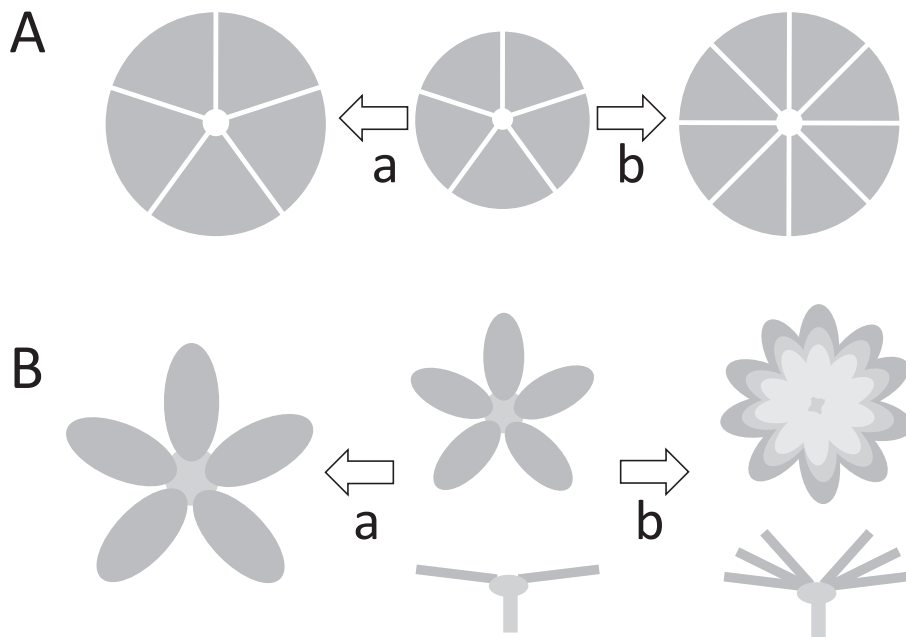
## 1. 花の大型化を誘導する形態変化

花の大型化は、大別して 2 種類の形態変化によって起

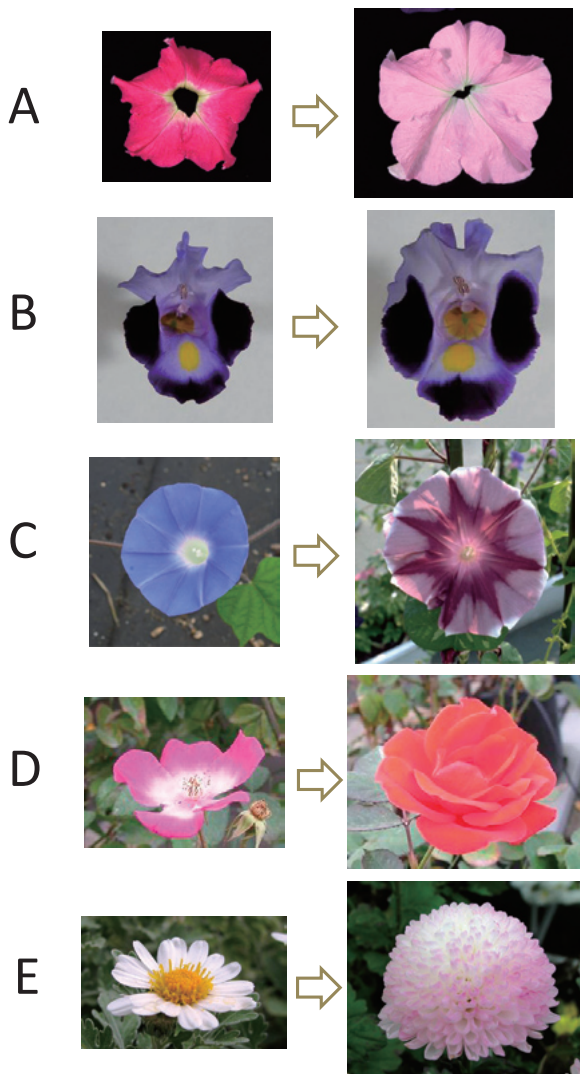
こる(第1図)。ひとつは、花弁数の増加による花の大型化である。合弁花冠のうち、花冠が完全に合着して漏斗状になる漏斗形花冠や、漏斗型花冠に近いが、花弁が完全に合着せずに裂片を持つ花冠は、花弁数の増加によって花冠の形が大きく変わることなく大型化する(第1図A-b)。例えばアサガオでは、野生型は5枚の花弁が合着した漏斗型花冠であるが、合着した花弁数が6~8枚に増加する州浜(*retracted*)遺伝子によって、花型が大きく変わることなく花が大型化する(Hagiwara, 1956; 第2図C)。このような花弁数の増加は、同じ花輪内での花弁数の増加であり、一重咲きの範囲を越えない。しかし、花弁数の増加が一重咲きの範囲を超えて八重化すると、花の形が著しく変化する。この変化は、花の頂部-基部軸の長さが増加する点で、花の大型化のひとつの様式であると考えられる(第1図B-b; 第2図D, E)。また、花が立体的になることで見た目のボリューム感が一層高まる点で、園芸学的な意味においても、八重化は花の大型化のひとつの様式と考えるのが妥当である。八重化は、いくつかの形態変化によって誘導される。第1の形態変化は、雄蕊や心皮が花弁に変換した結

果、花弁数が増加することによる八重化である。この変化による花の大型化は、バラ、シャクヤク、ポタン、ストックなどをはじめとする多くの花きに認められる(齋藤, 1959)。なお、この八重化では、心皮が花弁に変換するとともに花が無限成長性を獲得し、花弁数が元々の心皮数以上に増えることも多い。第2の形態変化は、花弁数の増加とともに雄蕊や心皮の数も増加する八重化である。ペチュニア、ホウセンカ、カーネーションなどの八重化がこの様式に相当する(齋藤, 1959)。第3の形態変化は、頭花を形成するキク科の花きで、舌状花が増加して八重化する場合である。この変化は、キク、ジニア、ダリアなどに認められる(齋藤, 1959)。第4の形態変化は、副花冠が発生する場合である。この変化による八重化は、キンギョソウで認められる(Yamaguchi et al., 2010)。

花弁数の増加以外に、花の大型化を誘導するもうひとつの主要な形態変化は、個々の花弁の拡大である(第1図A-a, B-a; 第2図A, B)。このような例は、キク、カーネーション、バラ、ペチュニア、パンジー等をはじめとして非常に多くの花きで認められ(齋藤, 1959),



第1図. 花の大型化を誘導する形態変化。図Aは、個々の花弁の拡大(a)ならびに花弁数の増加(b)による漏斗型花冠の大型化を示す。図Bは、離弁花、発達した裂片を持つ合弁花、頭花の大型化を示す。図Bにおいて、aは個々の花弁の拡大による花の大型化を示す。一方、bは、花弁数、あるいは舌状花数の増加によって花が八重化した結果、花の頂部-基部軸方向の長さが拡大することによって起こる花の大型化を示す。図Bの下段は花を側面から見た図であり、上段は花を正面から見た図である。



第2図. 様々な形態変化による花の拡大の実例。左側の写真は、野生(正常)型あるいはそれと同等の形態を持つ花を、右側の写真は、同じ種における大型化した花を示す(同じ種の左右の写真のスケールは同じ)。写真AおよびBは、個々の花弁の拡大による花の大型化を示す。写真CおよびDは、花弁数の増加による花の大型化を示す(この写真では、個々の花弁も拡大している点に注意)。写真Eは、舌状花数の増加による花の大型化を示す。写真A：ペチュニア (*Petunia hybrida* L.) の中輪品種(左) および大輪品種(右)。図B：トレンニア (*Torenia fournieri* Lind.) の2倍体(左,  $2n = 2x = 18$ ) および4倍体(右,  $2n = 2x = 36$ )。図C：アサガオ (*Ipomoea nil* (L.) Roth) の野生型系統(左) および大輪品種(右)。図D：バラ (*Rosa hybrids*) の一重品種(左) および八重品種(右)。図E：栽培ギクの祖先のひとつと考えられているリュウノウギク(左, *Chrysanthemum japonicum* (Makino) Kitam.  $2n = 2x = 18$ )、ならびに栽培ギク (*Chrysanthemum molifolium* Ramat.  $2n = 6x = 54$ ) の八重品種(右)。アサガオの写真は九州大学の仁田坂英二博士よりいただいた。図中の矢印は、直接の系統関係を示すものではなく、花の大型化へ向けての形態変化を表す。

最も一般的な花の大型化の様式である。日本語で「大輪化」という場合は、この様式による花の大型化を指す場合がほとんどである。この様式による花の大型化は、キンギョソウ (*Antirrhinum majus*) と、近縁の *A. linkianum* の交雑後代で認められるように、栄養器官(茎葉)の大きさの変化を伴わず、花器官特異的に起こる場合もあるが(Weiss et al., 2005)、様々な程度の茎葉の大型化を伴う場合が多い。

以上、花の大型化の個々の様式について述べたが、園芸用花きには、複数の様式が同時に起こることにより、大型化の程度が増強されている例もごく普通に見られる。例えば、八重化と花弁の大型化が組み合わせられ、花のボリュームが著しく増加している例は、キク、バラ、カーネーションをはじめとして、非常に多くの花きで認められる。

## 2. 花弁数の増加による花の大型化の分子機構

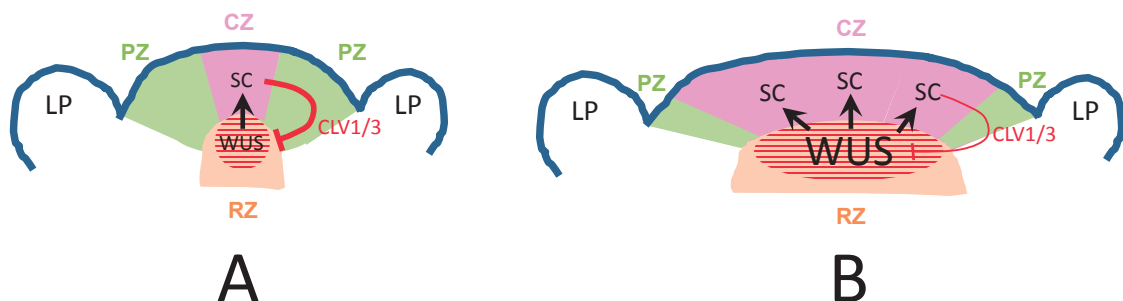
同じ花輪内での花弁数の増加による花の大型化の代表的な原因遺伝子であるアサガオの州浜遺伝子の本体は明らかになっていない。しかし、離弁花冠をもつシロイヌナズナでは、花弁数の増加に、花芽分裂組織の大型化が関与することが知られており、これに、*CLAVATA* (*CLV*) と *WUSCHEL* (*WUS*) の2種類の遺伝子が関与することが明らかにされている。このうち、*CLV1* は受容体キナーゼを、*CLV3* は、*CLV1* タンパク質のリガンドとして働く低分子量のタンパク質をコードしている(Clark, 1997; Fletcher, 1999)。一方、*WUS* は転写因子をコードしている(Brand et al., 2000; Mayer et al., 1998)。*WUS* は、茎頂分裂組織のうち、幹細胞が位置する中央帯の直下にある髄状分裂組織で発現し、中央帯の幹細胞を維持している(Schoof et al., 2000; 第3図)。一方、*CLV1* は髄状分裂組織で発現し、*CLV3* は中央帯で発現する。*CLV3* が髄状分裂組織に移動して *CLV1* と結合すると、*WUS* の発現を抑制し、器官分化を促進する(第3図A)。このようなフィードバック機構により、分裂組織の維持と器官分化の秩序が保たれている。*CLV* が機能欠損すると、この秩序が崩れて、*WUS* の発現が髄状分裂組織を取り囲む周辺分裂組織にまで拡大し、幹細胞の分布が周辺分裂組織にまで広がることにより、分裂組織が大型化する(Reddy and Meyerowitz, 2005; 第3図B)。器官の原基は一定の間隔で形成される傾向があるため、分裂組織が大型化すると、発生する器官数が増加する。*CLV* の機能欠損変異体では、花芽分裂組織も同様に大型化

し、その結果として花卉数が増える (Clark et al., 1993, 1995). この系にはサイトカイニンが影響を及ぼすことが知られている. サイトカイニンは, *WUS* の発現を促進するとともに *CLV1* の発現を抑制することによって分裂組織を大型化し, その結果, シロイヌナズナの花弁数を増加させる (Clark et al., 1993; Gordon et al., 2009; Lindsay et al., 2006; Venglat and Sawhney, 1996). これらは, 離弁花冠をもつシロイヌナズナで明らかにされている分子機構であるが, 合弁花冠, 特に漏斗型花冠で同様の分子機構によって花芽分裂組織の大型化が起これば, アサガオの州浜系統のように, 花卉数が増えて花の直径が拡大する. 一方, 離弁花冠では, この分子機構による花卉数の増加が著しくなると八重化が誘導され, 花の頂部-基部軸方向が拡大することで花が大型化する.

一方, 雄蕊や心皮の花弁化, つまり八重化による花の大型化は, ホメオティック遺伝子のうち, クラス C 遺伝子, あるいは, その発現を制御する遺伝子の変異によって起こる. 花の各花輪において形成される花器官の種類の決定機構は, いわゆる ABC モデルによって説明されており (Bowman et al., 1991; Coen and Meyerowitz, 1991), 花輪の外側から順番に, ホメオティック遺伝子のクラス A 遺伝子だけが発現する領域, クラス A およびクラス B 遺伝子の両者が発現する領域, クラス B および C 遺伝子が発現する領域, クラス C 遺伝子だけが発現する領域が形成され, それぞれの領域で萼, 花弁, 雄蕊, 心皮が形成される (第4図1). クラス A 遺伝子とクラス C 遺伝子はお互いの発現を抑制するため

(Drews et al., 1991; Gustafson-Brown et al., 1994), クラス C 遺伝子が機能低下すると, クラス A 遺伝子の発現が本来のクラス C 遺伝子の領域まで広がり, 雄蕊が花弁化する (Nitasaka 2007; 第4図2). さらに機能低下が著しくなると, 本来心皮の形成される領域に新たに花が形成され, それが繰り返す構造になる (第4図3). この場合, 実際には花器官が無限に形成されるわけではないものの, 花が無限成長性を獲得したと考えられる. この現象は, 次のような分子機構で起こる. つまり, クラス C 遺伝子は, *WUS* の発現を抑制することで, 花芽分裂組織の形成を抑制することにより, 花の無限生長を防いでいる (Lenhard et al., 2001; Lohmann et al., 2001). しかし, クラス C 遺伝子の機能低下によって *WUS* の発現が抑制されなくなると, 分裂組織の活性が低下せずに, 花の内側に新たな花が形成される. この場合, 第4図では, 萼と花弁が交互に形成される例が示されているが, 花弁のみが形成されたり, 花弁様であるが, 雄蕊などの他の花器官の特徴も兼ね備えた中間的な花器官が混在する場合も多い (Davies et al., 1999).

また, 頭状花序を形成するキク科植物では, 舌状花の増加によって八重化が起こり, 花が大型化する (第2図E). ガーベラでは, 舌状花の分化に, TCP 転写因子遺伝子である *CYCLOIDEA* (*CYC*) の発現が必要である (Broholm et al., 2008). *CYC* の発現は, 頭状花序の基部 (外側) から頂部 (内側) にかけて減少しており, 発現量の多い基部では舌状花が分化し, 発現量の低い頂部では管状花が分化する. *CYC* を過剰発現させると, 管状

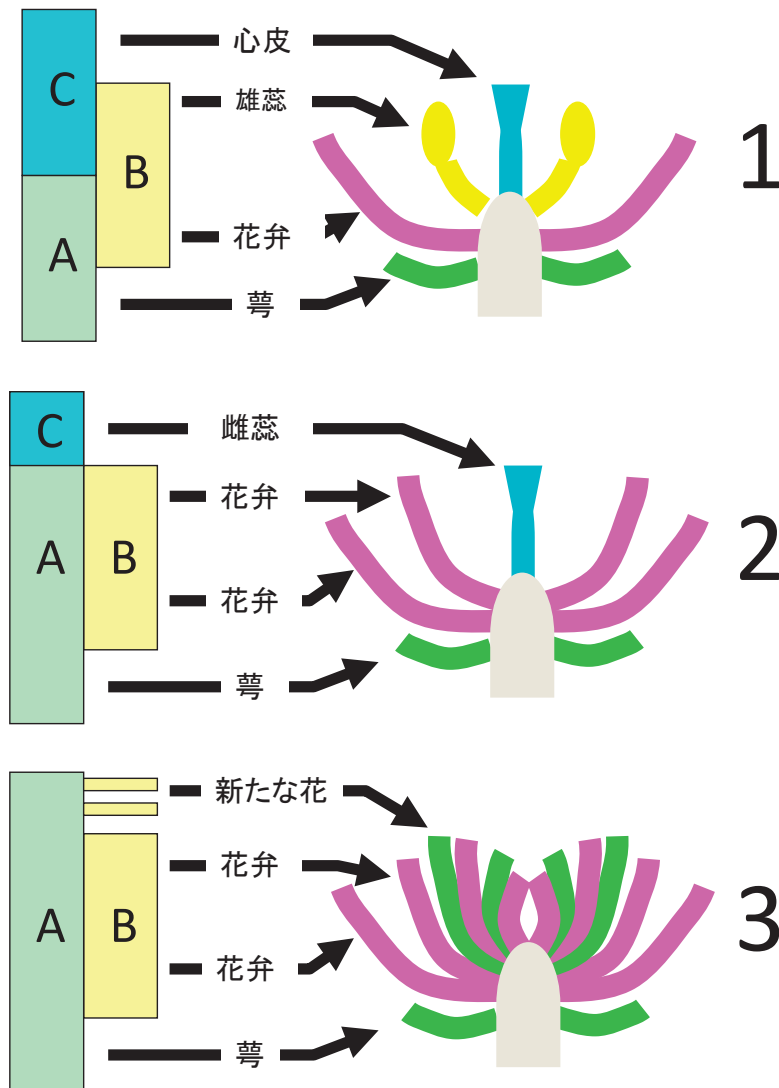


第3図. *WUSCHEL* (*WUS*) と *CLAVATA* (*CLV*) によるシロイヌナズナの茎頂部における形態形成の調節. 野生型 (A) では, *WUSCHEL* (*WUS*) は, 髄状分裂組織 (RZ, 橙色で表示) において, 幹細胞 (SC) が位置する中央帯 (CZ, 桃色で表示) の直下で発現し (発現領域を赤の横縞で表示), 幹細胞を形成・維持 (→) している. 一方, 中央帯で作られる *CLAVATA3* (*CLV3*) は, RZ で作られる *CLV1* と複合体 (図中の *CLV1/3*) を形成し, *WUS* の発現を抑制 (⊥) する. *CLV* の機能が低下すると (B), *WUS* の発現抑制が解除され (細い ⊥ で表示), 発現が周辺分裂組織 (PZ, 緑色で表示) にまで拡大して, CZ, ひいては分裂組織が拡大する. 同様の変化が花芽分裂組織に起こると, 花卉数が増加する. LP: 葉原基. Schoof et al. (2000), Reddy et al. (2005), Gordon et al. (2009) に基づいて作図した.

花が舌状花に変化する。

副花冠の発生に関しては、その分子機構は解明されていない。ただし、トレニアでは、サイトカイニンの酸化分解を阻害して植物体内にサイトカニンを蓄積させるホルクロルフェニユロン (CPPU) の花芽への投与により、雄蕊の托葉由来と推定される副花冠が形成され、八重化するため、サイトカニンが何らかの役割を担っていると予想される (Nishijima et al., 2006)。この場合、CPPU 処理は、処理時の花芽の発達ステージに依存して、幅広い形と細長い形の2種類の副花冠を誘導する。花の大型化には、実際のサイズの拡大においても、視覚に及

ぼす効果においても、細長い副花冠よりも幅広い副花冠を誘導した方が有効である。副花冠の形は、花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンによって制御されており、クラス A 遺伝子とクラス B 遺伝子の発現が高いと幅広い形になり、クラス B 遺伝子の発現が高く、クラス A 遺伝子とクラス C 遺伝子の発現がともに低い状態で拮抗すると、雄蕊の特徴を部分的に兼ね備えた細長い形になる (Niki et al., 2012)。幅広い副花冠は花弁の基部から発生し、細長い副花冠は花弁の縁辺部と筒部の境界付近から発生するが、副花冠における以上のような花器官ホメオティック遺伝子の発現パターンは、副花冠が



第4図. 雄蕊および雌蕊の花弁化による八重化の分子機構. 図中の1, 2, 3は、それぞれ、一重、雄蕊の花弁化による八重、雌蕊の花弁化に加えて無限成長性を備えた八重を表す. 図中A, B, Cは、それぞれクラスA、クラスB、クラスC遺伝子とその発現領域を示す. 花の構造を表す図(右側)において、青は雌蕊、黄は雄蕊、赤は花弁、緑は萼を表す.

発生する花卉の部位における発現パターンと一致している (Niki et al., 2012). したがって、副花冠におけるホメオティック遺伝子の発現パターン、ひいてはその形態は、花芽における副花冠の発生位置に依存して決定されると考えられる。

### 3. 花卉の大型化の分子機構

花卉が形の変化を伴わずに大型化する分子機構としては、ゲノムの倍数体化ならびに個々の遺伝子の変異が知られている。まず、倍数体化に伴う花の大型化は、バラ、ダリア、カーネーション、キンギョソウ、グラジオラス、ペチュニアなどをはじめとする多くの花きで、古くから育種に利用されてきた (齋藤, 1959)。この場合、遠縁交雑による雑種性の高い個体に生じる偶発的な倍数体化を利用する場合と、紡錘糸の形成を阻害するコルヒチンに代表される化学薬品処理による人為的倍数体化を利用する場合がある (齋藤, 1959; 松尾, 1971)。倍数体化による花の大型化は、細胞体積の増加を利用するものである (松尾, 1971)。倍数体化によって細胞体積が増加する分子機構は未だに解明されていない。しかし、これとよく似た現象である「核内倍加」に関しては解析がなされている。核内倍加は、細胞周期のS期において核DNAが複製された後、核分裂および細胞分裂しないことによって個々の細胞単位で倍数体化する現象である。核内倍加を起こした細胞は、通常、倍数体化した細胞と同様に細胞体積の増加を伴い、シロイヌナズナでは、葉の細胞サイズと核内倍加による細胞の倍数性に関して比例関係が認められている (Melaragno et al., 1993)。また、核内倍加が欠損した変異体を用いた解析から、核内倍加は、倍数体化と部分的に同じ分子機構を通じて細胞サイズを増加させることが予想されている (Breuer et al., 2007)。

個々の遺伝子の変異、あるいは発現状態の人為的調節によって花の大型化が誘導される例もいくつか知られている。このうち、シロイヌナズナではいくつかの遺伝子に関して分子機構の解明が進んでいる。オーキシンの極性輸送を司る *REVOLUTA/INTERFASCICULAR FIBERLESS1 (REV/IFL1)* の変異により、シロイヌナズナの花弁を含む花器官および葉が大型化して厚くなり、茎が太くなるが、この形態変化は、細胞数の増加によっている (Talbert et al., 1995; Zhong and Ye, 2001)。 *REV/IFL1* は2次分裂組織の形成を制御しており、器官の大型化は、この遺伝子の機能欠損によって、細胞分裂

が野生型よりも後のステージまで続くために起こる。

また、AP2ファミリーの転写因子遺伝子であり、オーキシンによって発現誘導される *AINTEGUMENTA (ANT)* を過剰発現すると、シロイヌナズナの花弁を含む花器官および葉が大型化ならびに肥厚し、茎が太くなるが、この形態変化も細胞数の増加によるものである (Krizek, 1999; Mizukami and Fischer, 2000)。 *ANT* の過剰発現により、細胞分裂におけるG1期サイクリン遺伝子である *Cyclin D3* が、本来発現していない成熟した葉にも認められるようになる。したがって、 *ANT* の過剰発現は、細胞分裂能を長い期間維持することによって器官の細胞数を増加させ、花の大型化を誘導することが示唆されている。

同じくオーキシンによって発現誘導される *ARGOS* も、過剰発現によってシロイヌナズナの花弁を含む花器官および葉を大型化し、茎を太くする (Hu et al., 2003)。 *ARGOS* を過剰発現させると、 *ANT* の発現が誘導される。また、 *ANT* の欠損変異体では、 *ARGOS* の過剰発現による器官の大型化は認められないため、 *ARGOS* は *ANT* の発現誘導を通じて器官を拡大することが示唆されている。以上から、 *ARGOS* は、オーキシンの初期情報伝達を司る *ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR; Chapman and Estelle, 2009)* の下流で、オーキシシグナルを細胞分裂および器官の成長制御のシグナルに変換する役割を担っていると考えられている。また、ペチュニアで、ベンジル CoA: ベンジルアルコール/フェニルエタノールベンジルトランスフェラーゼ遺伝子 (*BPBT*) をRNAi法によってノックダウンすると、オーキシン輸送の促進によると考えられる花冠の拡大が起こる (Orlova et al., 2006)。これらの研究は、花の大型化にとって、オーキシンが重要な役割を果たしていることを示している。

サイトカイニンの生合成遺伝子であるアデノシンリン酸-イソペンテニル転移酵素遺伝子 (*IPT*) を、花器官ホメオティック遺伝子である *APETALA3 (AP3)* のプロモーターによって花弁および雄蕊特異的に発現させ、これらの器官にサイトカイニンを蓄積すると、ペチュニアの花弁が大型化する (Verdonk et al., 2008)。この報告は、オーキシンとともにサイトカイニンが、花の大型化に関与していることを示している。

以上の研究は、直接花卉の大型化について分子機構を解析した例であるが、葉にまで対象を拡大すると、オーキシンおよびサイトカイニン以外の系による拡大も報告されている。葉は花卉の相同器官であり、また、前

述のように、花卉が大型化した花き類では葉も大型化していることが多いので、葉の大型化に関する分子機構は、花の大型化にも関与している可能性が高い。そのような例として、ジベレリンの生合成遺伝子である GA 20 酸化酵素遺伝子を過剰発現させると、ジベレリンの蓄積により、シロイヌナズナの葉が大型化する (Coles et al., 1999; Gonzalez et al., 2010; Huang et al., 1998)。また、液胞型 H<sup>+</sup>-ピロホスファターゼ遺伝子の *AVP1* を過剰発現すると、シロイヌナズナの葉が拡大する (Li et al., 2005; Gonzalez et al., 2010)。この現象は、以前は、*AVP1* がオーキシンの極性輸送を促進することによって葉を大型化したと解釈されたが、現在ではこの解釈は否定され、細胞質に存在するピロリン酸の分解を促進することによって芽生えの糖新生を促進した結果、葉が大型化したと考えられている (Ferjani et al., 2011)。

以上の研究は、オーキシン、サイトカイニンに関連する分子機構が花卉の大型化に関与することを示している。また、ジベレリンならびにエネルギー代謝に関連する系も、花卉の大型化に関与する可能性がある。

#### 4. ペチュニアの花の大型化と植物ホルモン

ここからは、ペチュニアの花の大型化とサイトカイニンとの関係を解析した筆者らの研究を中心に紹介する。

##### 1) ペチュニアにおける遺伝的な花の大型化

ペチュニアの花は、5枚の花弁が合着した漏斗型花冠である。ペチュニアの大輪品種における花の大型化

は、ひとつの主働遺伝子である *Grandiflora* (*G*) 遺伝子によってもたらされている (Ewart, 1984)。*G* 遺伝子は、アサガオの州浜遺伝子のように花卉数を増加させるのではなく、個々の花弁を拡大することによって花を大型化するとともに、花弁を厚くする (Ewart, 1984)。また、*G* 遺伝子の作用は花弁だけに限らず他の器官にも及ぶ。つまり、萼を拡大し、厚くするほか、茎も太くするが、特に、萼の拡大は顕著である。*G* 遺伝子は半優性遺伝子であり、大輪品種は *Gg* 遺伝子型をもつ。一方、*GG* 遺伝子型の個体は、大型の花をつけるが、茎葉が軟弱になり、弱勢になるとともに稔性も低下する。*G* 遺伝子の実体は未だに解明されていないが、*G* 遺伝子による花の大型化の変異は 19 世紀末には知られていた (齋藤, 1959)。しかし、*GG* 遺伝子型の個体が弱勢で稔性が低いことから、*Gg* 遺伝子型を F<sub>1</sub> 品種として市販品種に用いることに成功したのは 20 世紀後半 (1968 年) になってからである (齋藤, 1959)。このように、1 遺伝子支配で花の大型化が起こる点で、ペチュニアは花の大型化の分子機構の解析に好適である。

##### 2) 植物ホルモン処理によるペチュニアの花の大型化

ペチュニアのように、個々の遺伝子によって花卉数が変化せずに花冠の大型化が誘導される場合、前述のように、植物ホルモンに関連する分子機構が関与している場合が多い。そこで、成長促進作用を持つ種々の植物ホルモンをペチュニアの若い花冠に与えてみた。その結果、サイトカイニン投与によって花冠縁辺部の面積が最大 2.4 倍に増加する著しい花の大型化が認められる (第

第 1 表. 植物ホルモンおよび関連化合物の処理がペチュニアの花冠の拡大に及ぼす影響.

植物ホルモン	化合物名 (処理濃度 単位 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	最大増加率 <sup>v</sup> (処理濃度 単位 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
サイトカイニン	BA <sup>z</sup> (10-1000)	2.3 (100)
	CPPU <sup>y</sup> (0.1-10)	2.4 (3.2)
ジベレリン	GA <sub>3</sub> (10-300)	1.3 (100)
オーキシン	NAA <sup>x</sup> (1-300)	1.0
	4-CPA (0.1-30) <sup>w</sup>	1.0
ブラシノステロイド	ブラシノライド (0.1-100)	1.0

中輪品種 'パール・ホワイト' を供試した。

<sup>z</sup> 6-ベンジルアミノプリン。

<sup>y</sup> ホルクロールフェニユロン。

<sup>x</sup> 1-ナフトレン酢酸。

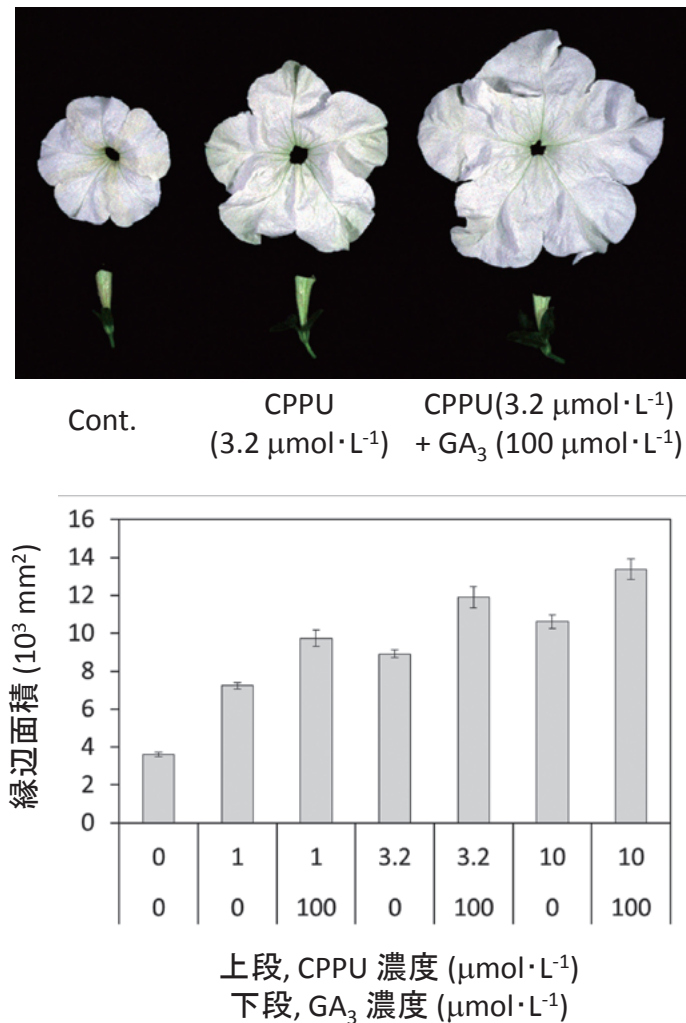
<sup>w</sup> 4-クロロフェノキシ酢酸。

<sup>v</sup> 処理による縁辺面積の最大増加率 ( $n = 10$ )。

1表, 第5図). また, ジベレリンの投与も花の大型化を誘導するが, その程度は最大で1.3倍と小さい. サイトカイニンとジベレリンを同時に与えると相乗作用が見られ, ホルクロルフェニユロン (CPPU) 3.2  $\mu\text{M}$  と  $\text{GA}_3$  100  $\mu\text{M}$  の組み合わせで, 花冠の縁辺面積が無処理の3.3倍に増加する (第5図. 図中では, CPPU 10  $\mu\text{M}$  と  $\text{GA}_3$  100  $\mu\text{M}$  の組み合わせで縁辺面積の増加率が最大になったが, この濃度では花卉のしわなどの副作用が認められた. また, この実験では, サイトカイニンの酸化分解を阻害して植物体内にサイトカイニンを蓄積させる CPPU を与えたが (Bilyeu et al., 2001), 分子自体にサイトカ

イニン活性を持つ6-ベンジルアミノプリン (BA) を与えても同様の変化が起こる). 一方, NAA, 4-CPA, ブラシノライドには花冠を拡大する効果は認められない.

サイトカイニンおよびジベレリンを与えた場合, 花卉数が増えずに花卉そのものが大きくなる (第5図). サイトカイニン処理による花の大型化は細胞数の増加によるものであるのに対して, ジベレリンによる花の大型化は, 主に細胞の拡大によるものである. この点で, サイトカイニンは細胞数を増加させる働きを持つ *G* 遺伝子と共通の解剖学的変化をもたらす (Nishijima et al., 2006). さらに, *G* 遺伝子によってペチュニアの茎葉が



第5図. ペチュニアの花冠の拡大に及ぼすサイトカイニンおよびジベレリン処理の相乗作用. 中輪品種 'パール・ホワイト' を供試. サイトカイニンの酸化分解を阻害し, 植物体内にサイトカイニンを蓄積させるホルクロルフェニユロン (CPPU; Bilyeu et al., 2001) とジベレリン ( $\text{GA}_3$ ) を, Nishijima et al. (2006) に示された方法で若い花冠に点滴処理した. 誤差線は  $\pm$  SE ( $n = 10$ ).

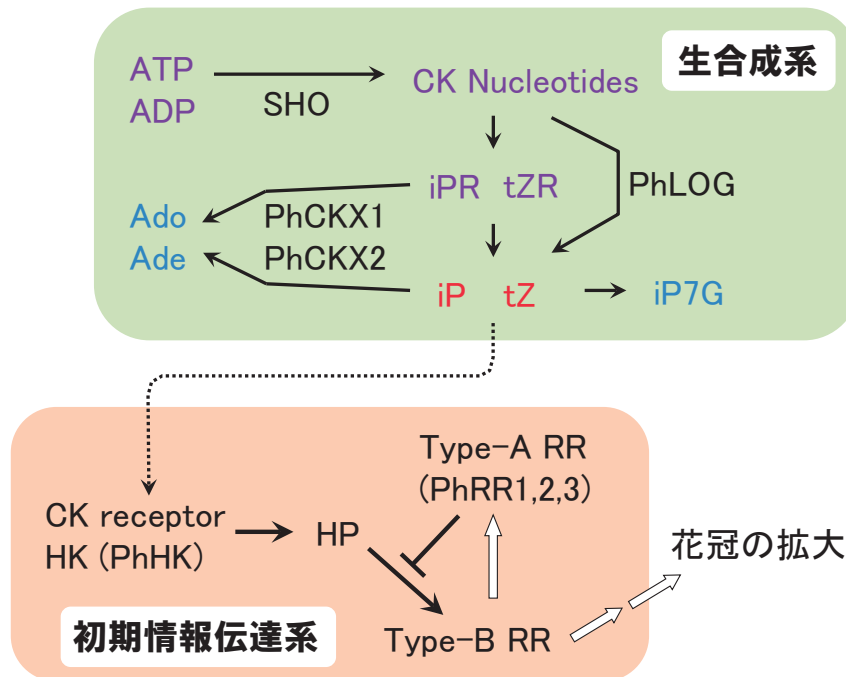


薄い緑色になる現象は、サイトカニンを与えたときにも起こる（西島，未発表データ）。これらの結果から、*G* 遺伝子によるペチュニアの花の大型化に、サイトカニンが何らかの関係を持つことが予想される。

### 3) ペチュニアの花冠におけるサイトカニンの生合成と情報伝達系

ペチュニアの花冠において機能していることが推定されるサイトカニンの生合成ならびに初期情報伝達系を第6図にまとめた。植物体内におけるサイトカニン生合成の第1段階では、アデノシンリン酸-イソペ

ンテニル転移酵素 (IPT) によって、アデニンヘイソペンテニル側鎖が導入され、ヌクレオチド型サイトカニンが合成される (Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001)。ペチュニアでは、第6図における SHO (Zubko et al., 2002) が IPT に相当する。次に、サイトカニンリボシド5' ーリン酸フォスホリボヒドロラーゼ (LOG) によって、ヌクレオチド型サイトカニンから活性型の遊離型サイトカニンが合成される (Kurakawa et al. 2007)。ヌクレオチド型サイトカニンから、まずヌクレオチダーゼによってヌクレオシド型サイトカニンが合成され、次いで、ヌクレオシダーゼによって遊離型サ



第6図. ペチュニアの花冠で機能していることが推定されるサイトカニン生合成系(上段の緑の背景)ならびに初期情報伝達系(下段の橙色の背景)。CK: サイトカニン。サイトカニン生合成系の図では、生合成経路を黒の矢印で、対応する生合成酵素を黒字で示した。一方、活性型サイトカニンは赤色、その前駆体は紫色、不活性型サイトカニンおよびサイトカニンの分解産物は青色の文字で示した。iP:  $N^6-(\Delta^2-$ イソペンテニル) アデニン。tZ: トランスゼアチン。iPR:  $N^6-(\Delta^2-$ イソペンテニル) アデニンリボシド。tZR: トランスゼアチンリボシド。iP7G:  $N^6-(\Delta^2-$ イソペンテニル) アデニン-7-グルコシド。Ado: アデノシン。Ade: アデニン。SHO: ペチュニアアデノシンリン酸-イソペンテニル転移酵素。PhLOG: ペチュニアサイトカニンリボシド5' ーリン酸フォスホリボヒドロラーゼ。PhCKX: ペチュニアサイトカニン酸化酵素。黒の点線矢印は活性型サイトカニンの受容体への結合を示す。サイトカニン初期情報伝達系の図では、黒字はサイトカニンシグナルをリン酸リレーによって伝達するタンパク質を、記号は、分子間相互作用によるシグナルの促進( $\rightarrow$ ) および抑制( $\dashv$ )、ならびに遺伝子の発現促進( $\rightleftharpoons$ )を示す。HK: ヒスチジンキナーゼ。PhHK: ペチュニアサイトカニン受容体。HP: HPt 因子。Type-A RR: タイプ A レスポンスレギュレーター。Type-B RR: タイプ B レスポンスレギュレーター。PhRR: ペチュニアタイプ A レスポンスレギュレーター。サイトカニン生合成の図は Sakakibara(2006) および Kurakawa(2007)、サイトカニン初期情報伝達系の図は Oka (2005) および Mizuno(2005) に基づいて作図した。

イトカイニンが合成されるとするモデルもあるが、その酵素遺伝子は同定されていない (Chen and Kristeit, 1981a, 1981b). 一方、サイトカイニンの不活性化は、サイトカイニンの側鎖を酸化するサイトカイニン酸化酵素 (CKX) (Schmüllung et al., 2003) ならびに、グルコシダーゼによる配糖体化によって制御されている (Hou et al., 2004).

これらのサイトカイニン生合成遺伝子のうち、ペチュニアの花冠で発現している遺伝子として、*SHO* (*IPT*に相当)、*PhLOG*、*PhCKX1* および *PhCKX2* が同定されており (Nishijima et al., 2011a)、ペチュニアでも同様の生合成系が機能していると考えられる。しかし、シロイヌナズナでは、ゲノムに *IPT* が7種類、*LOG* が7種類、*CKX* が7種類存在するので (Takei et al., 2001; Kuroha et al., 2009; Schmüllung et al., 2003)、ペチュニアでも、同定されたこれらの遺伝子以外にもパラログが存在する可能性が高い。

一方、サイトカイニンの初期情報伝達系は、いわゆる2成分制御系によって構成されている (Oka, 2005; Mizuno, 2005)。サイトカイニン受容体はヒスチジンキナーゼであり、これにサイトカイニンが結合すると、His-Asp リン酸リレー系によって、HPt 因子を通じてタイプB レスポンスレギュレーターへとリン酸が受け渡される。タイプB レスポンスレギュレーターは転写因子であり、リン酸化によって標的遺伝子を発現調節する。タイプB レスポンスレギュレーターがリン酸化されると、タイプA レスポンスレギュレーター遺伝子が発現誘導され、HPt 因子からタイプB レスポンスレギュレーターへのリン酸の伝達に負のフィードバックがかかると考えられている (Rashotte et al., 2003)。

ペチュニアの花冠で発現しているサイトカイニン初期情報伝達系遺伝子として、サイトカイニン受容体遺伝子の *PhHK*、タイプA レスポンスレギュレーター遺伝子の *PhRR1-3* が同定されており、ペチュニアの花冠でも同様の情報伝達系が機能していると考えられる (Nishijima et al., 2011b)。シロイヌナズナでは、サイトカイニン受容体遺伝子が3種類、タイプA レスポンスレギュレーター遺伝子が10種類存在するので (Imamura et al., 1999; Inoue et al., 2001; Ueguchi et al., 2001)、ペチュニアでも、これらの遺伝子以外にパラログが存在する可能性が高い。

サイトカイニン初期情報伝達系を構成するこれらの要素のうち、タイプA レスポンスレギュレーター遺伝子は、サイトカイニン処理によって発現が短時間で上昇

し、サイトカイニンシグナルに応じて変化する性質を持つ (Brandstatter and Kieber, 1998; Taniguchi et al., 1998)。一方で、タイプA レスポンスレギュレーター遺伝子は、ファイトクロームB による光応答系や (Sweere et al., 2001)、細胞の分裂能の制御に関わる転写因子 *WUS* (Leibfried et al. 2005)、オーキシンのシグナル伝達に関与する転写因子 *AUXIN RESPONSE FACTOR 5/MONOPTEROS* (Zhao et al., 2010) による発現制御も受けることが報告されているが、サイトカイニンシグナルによる発現変化は顕著である。また、シロイヌナズナでは、サイトカイニン受容体のひとつである *AHK4* の発現がサイトカイニン投与によっても高まる (Kiba et al., 2004)。以上のようなサイトカイニンシグナルによる顕著な発現上昇は、ペチュニアの *PhRR1-3*、*PhHK* でも確認されている (Nishijima et al., 2011a, 2011b)。

#### 4) ペチュニアにおける花の大型化とサイトカイニン生合成・情報伝達との関係

ペチュニアの花冠の発達においては、最初に主として細胞分裂が進行し、その後に細胞の拡大が起こる (Nishijima et al., 2006)。花冠の細胞数、ひいては最終的な花冠の大きさを決定する細胞分裂期には、*G* 遺伝子の遺伝子型により、サイトカイニンの生合成系および初期情報伝達系に顕著な変化が起こる。

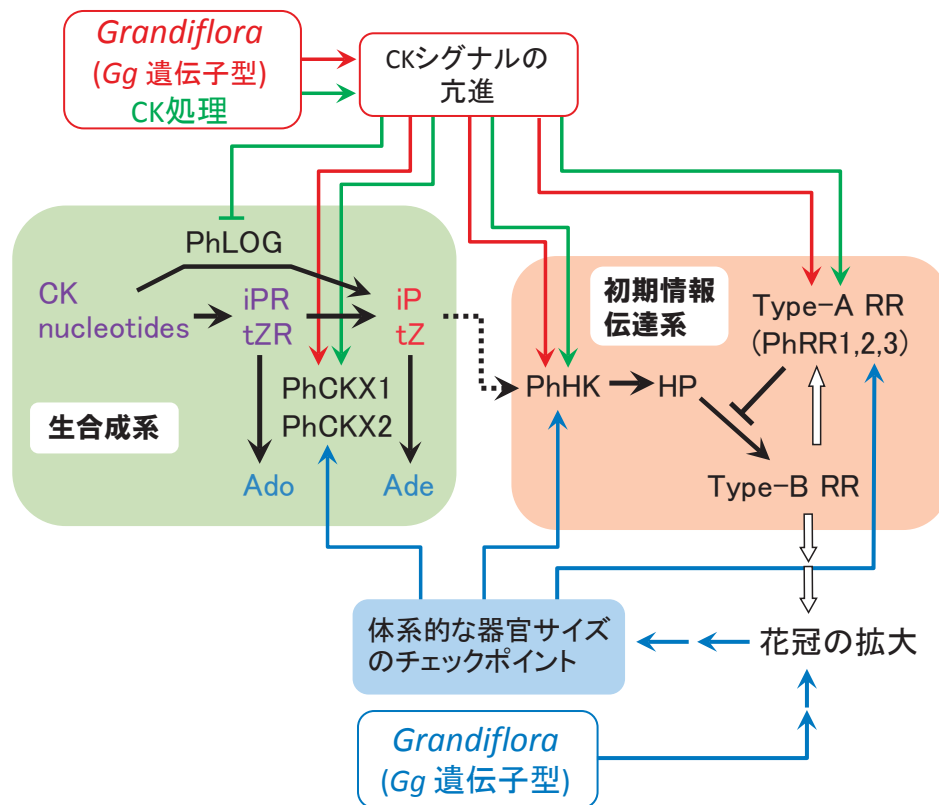
内生サイトカイニン濃度は、遊離型、ヌクレオシド型、グルコシド型とも、*gg* 遺伝子型を持つ中輪品種に比較して *Gg* 遺伝子型をもつ大輪品種で低い (Nishijima et al., 2011a)。これは、*PhCKX1*、*PhCKX2* の発現が *Gg* 遺伝子型で高まり、サイトカイニンの酸化分解が促進されるためである。このような *PhCKX* の発現促進は、サイトカイニンを与えたときの変化と共通のものである。一方で、*PhLOG* は、サイトカイニンを与えたときには発現抑制されるが、*Gg* 遺伝子型による発現抑制は起こらない。一方、サイトカイニン情報伝達系では、*PhHK* および *PhRR1-3* の発現が、*gg* 遺伝子型に比較して *Gg* 遺伝子型で顕著に高まる (Nishijima et al., 2011b)。これらの発現促進も、サイトカイニン投与による変化と共通のものである。以上のように、サイトカイニン生合成系および情報伝達系には、*Gg* 遺伝子型によって、一部の遺伝子の例外を除き、サイトカイニン応答によるものと共通の変化が起こる。

このようなサイトカイニン生合成系および初期情報伝達系における遺伝子発現の変化の原因として、2つの可能性が考えられる。ひとつは、*Gg* 遺伝子型がサイトカイ

ニン応答を高める作用をもち、その結果としてこのような遺伝子発現の変化を誘導した可能性である（第7図赤矢印）。その原因は、初期情報伝達系の遺伝子にサイトカニンシグナルを恒常的に出し続けるような変異がある場合や（Kim et al., 2006）、他の2成分制御系からのクロストークによってサイトカニンシグナルが亢進する場合（Kakimoto, 1996）が考えられる。もうひとつの可能性としては、花の大型化の変異がサイトカニンの系とは独立して存在し、過剰な花冠サイズを抑制するために、サイトカニン生合成系および初期情報伝達系へ負のフィードバックがかかった可能性である（第7図青矢印）。このようなフィードバックがかかるためには、過剰な花冠サイズを検知してフィードバックを誘導する何らかの分子機構の存在が前提となる。そのような分子機構として、実体は明らかになっていないものの、

「体系的な器官サイズのチェックポイント」と呼ばれる分子機構の存在が提唱されている（Weiss et al., 2005）。

以上の2つの可能性のいずれの場合も、*Gg* 遺伝子型が、サイトカニンの生合成系および情報伝達系に負のフィードバックをかけていると考えられる。なぜならば、*CKX* とタイプ A レスポンスレギュレーター遺伝子は、発現上昇することにより、それぞれサイトカニン濃度を低下させ、サイトカニンシグナルを抑制するからである。実際に、*CKX* は、過剰発現により内生サイトカニン濃度を低下させ、植物体を小型化することが、シロイヌナズナとタバコで確認されている（Werner et al. 2001, 2003）。また、タイプ A レスポンスレギュレーター遺伝子は、過剰発現によってサイトカニン応答を抑制することがシロイヌナズナで確認されている（Kiba et al., 2004）。これに対して、サイトカニン受容体遺



第7図. ペチュニアの大輪化において *Grandiflora* (*G*) 遺伝子がサイトカニン生合成系および初期情報伝達系に及ぼす作用に関する2つの仮説。第1の仮説では、*G* 遺伝子はサイトカニンシグナルの亢進を通じて花冠を拡大する(赤矢印で表示)。この場合、*G* 遺伝子は、サイトカニンを処理した場合の調節経路(緑色の矢印で表示)と概ね同じ経路でサイトカニン生合成系および初期情報伝達系を調節する。第2の仮説では、*G* 遺伝子はサイトカニンとは無関係の系を通じて花冠を拡大する(青矢印で表示)。この場合、花冠の拡大に伴い、存在が仮定されているが分子機構は明らかになっていない「器官サイズの体系的チェックポイント」(Weiss et al., 2005)からの経路でサイトカニン生合成系ならびに初期情報伝達系が調節される。サイトカニン生合成および情報伝達系における略号および記号は第6図の説明を参照していただきたい。

伝子の発現上昇に関しては、その作用がよく分かっていない。サイトカニン受容体は、サイトカニンが結合すると、ヒスチジンキナーゼドメインによるレシーバードメインのリン酸化によって活性化される (Stock et al., 2000)。一方で、ヒスチジンキナーゼドメインおよびレシーバードメインはフォスファターゼ活性も持っており、レシーバードメインの脱リン酸化によってヒスチジンキナーゼを不活性化する (Stock et al., 2000)。このような両義的な作用のため、*PhHK* の高い発現がどのような効果を持つのかを検証するためには、*PhHK* を過剰発現させた組換え体を作る必要がある。我々の作製した過剰発現体では、花を含む器官の大型化は認められず、少なくとも、*PhHK* の過剰発現がサイトカニンシグナルの増加には働かないと考えられる (西島, 未発表データ)。

以上から、ペチュニアの *Gg* 遺伝子型系統では、上記のように、花の大型化に対して負のフィードバックがかかっていると考えられる。それと同時に、花の大型化を促進する機構が働いており、この両者のバランスによって花の大きさが決まると考えられる。

### 5) *G* 遺伝子が各器官の拡大に及ぼす影響

以上のように、*G* 遺伝子によるサイトカニン生合成系ならびに初期情報伝達系の変化が明らかになっても、*G* 遺伝子の本体は依然として不明である。しかし、*G* 遺伝子によるタイプ A レスポンスレギュレーター遺伝子、*CKX* 遺伝子等の発現変化を指標にして、*G* 遺伝子がペチュニアの各器官の成長をどのように制御しているかを間接的に知ることができると考えられる。

*G* 遺伝子型以外の遺伝的背景を均一化した戻し交雑系統 (BC<sub>4</sub> 世代) における、葉、ならびに葉と相同な花の各器官 (萼, 花冠, 雄蕊, 心皮) の、*gg* 遺伝子型に対する *Gg* 遺伝子型の面積増加率は、葉よりも、心皮以外の花器官で高く、特に萼では高い (第 8 図, 第 9 図)。 *Gg* 遺伝子型において発現上昇するサイトカニン生合成系および初期情報伝達系の遺伝子のうち、発現量が多く主要な遺伝子と考えられる *PhCKX2* と *PhRR2* の、*gg* 遺伝子型に対する *Gg* 遺伝子型の発現量の増加率は、*PhCKX2* では葉に比較して花冠, 雄蕊, 心皮で高く、また、*PhRR2* は、葉に比較して全ての花器官で高い。これらの結果から、花器官では、一部の例外はあるものの、概ね、*Gg* 遺伝子型による面積増加率ならびに *PhCKX2* および *PhRR2* の発現量増加率が葉に比較して大きい。このような傾向は、やや不明瞭にはなるものの、他のサイトカニン酸化酵素遺伝子 (*PhCKX1*) およびタイプ A レス

ポンスレギュレーター遺伝子 (*PhRR1* および *PhRR3*) でも認められる (西島, 未発表データ)。

これらの結果に関しては、上記の 2 つの仮説、つまり、1) *Gg* 遺伝子型がサイトカニン応答を高める作用をもつ可能性、2) *Gg* 遺伝子型がサイトカニンの系とは別の系によって花を大型化し、その結果、サイトカニン生合成系および初期情報伝達系へ負のフィードバックがかかった可能性、のうち、どちらが正しいかによって解釈が異なる。1) の仮説が正しい場合には、遺伝子発現量から予測した場合、*Gg* 遺伝子型は、栄養器官と比較して花器官、特に花冠で、より強くサイトカニンシグナルを高める作用を持つことが推察される。このような選択性により、実際の測定結果 (第 9 図上段) に見られるように、*Gg* 遺伝子型によって、花器官の拡大の程度が葉のそれよりも大きくなると考えられる。これに対して、2) の仮説が正しい場合には、花器官における遺伝子発現の増加率がより高かったことは、器官の大きさの制御が、栄養器官に比較して花器官でより厳密に行われていることを意味すると考えられる。ペチュニアの祖先とされている *P. axillaris* と *P. integrifolia* は虫媒花であり、訪花昆虫に合わせて花の形および大きさが共進化している (Ando et al., 2001; Galliot and Hoballah, 2006)。この点で、花の大きさと形は、子孫を残すために、栄養器官に比較してより厳密に制御される必要がある。このような進化上の必然性が、花器官の大きさの制御においてより強いフィードバックを生じさせたのかもしれない。特に、花冠では面積増加率に比較して遺伝子発現量の増加率が高く、厳密に大きさが制御されていることが伺われる。

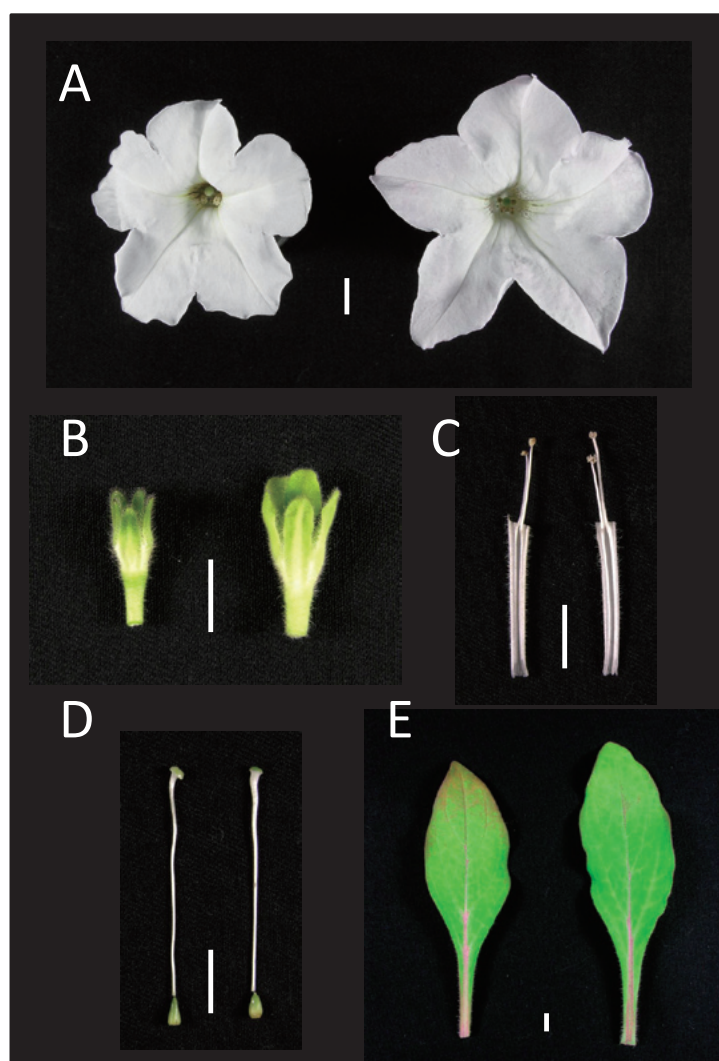
### 5. ペチュニアの花はさらに大型化できるか?

ペチュニアの花の大型化の育種に利用できる主働遺伝子は、前述のように *G* 遺伝子ひとつだけしか存在しない (Ewart, 1984)。この遺伝子は花の大型化にとってきわめて有効なものであるが、上述のように、ホモ接合になると弱勢になり、花粉生産量も低下する欠点も持っている (Ewart, 1984)。今後、ペチュニアの花のさらなる大型化を目指すためには、*G* 遺伝子を同定し、花の大型化の分子機構と併せて、このような欠点をもたらしめている分子機構についても解明することが望ましい。このためには、連鎖地図を利用した遺伝学的アプローチが有効かもしれないが (Bossolini et al., 2011)、1200-1500 Mbp と推定されているペチュニアの大きなゲノムサイ

ズ (Mishiba et al., 2000) が遺伝子単離の障壁となる可能性が高い。このほか、豊富な EST データ (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) を利用し、*gg* 遺伝子型と *Gg* 遺伝子型の系統間のトランスクリプトーム解析を行いことにより、*G* 遺伝子によって調節されている遺伝子発現ネットワークを明らかにする方法も考えられる。

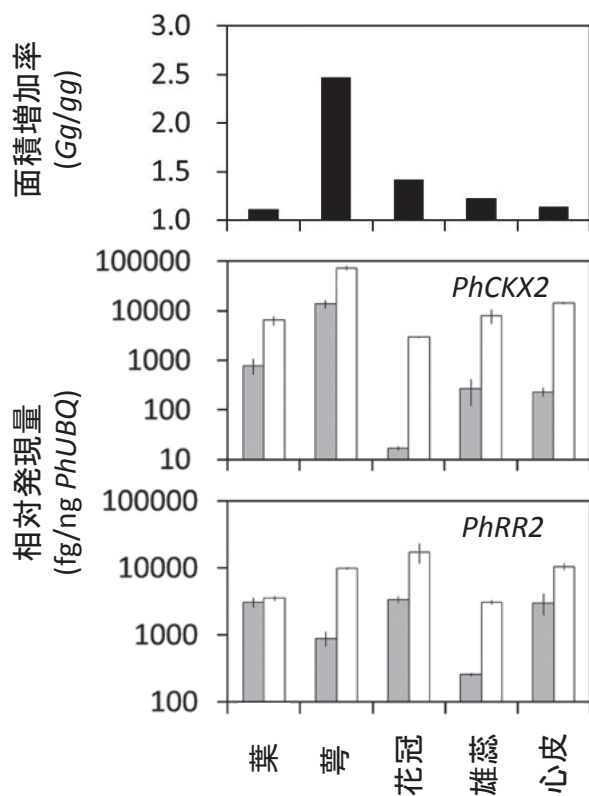
しかし、*G* 遺伝子の同定に至らなくても、これまでに解明されている *Gg* 遺伝子型個体におけるサイトカイニン関連遺伝子の発現調節パターンに基づいて *G* 遺伝子の修飾遺伝子を予測し、その変異を見いだして育種に利用する方法も考えられる。そのような変異として、*Gg* 遺伝子型によるサイトカイニン生合成系および初期

シグナル伝達系における負のフィードバックを抑制する変異が有効であろう。このうち、サイトカイニン生合成系においては、*CKX* がこのフィードバックを媒介している (第7図)、*CKX* の機能の低下によってさらなる花の大型化が期待できる。実際に、*CKX* の阻害剤である CPPU を、ペチュニアの大輪品種 (*Gg* 遺伝子型品種) に与えた場合、さらなる花冠の拡大が認められた (Nishijima and Shima, 2006)。このことは、ペチュニアの花の大型化が *G* 遺伝子によって飽和状態に達したわけではなく、*CKX* の機能抑制によってさらに大型化する余地を残していることを示している。同様に、シロイヌナズナでも、*CKX3* および *CKX5* の T-DNA 挿入二重



第8図. *Grandiflora* (*G*) 遺伝子に関する戻し交雑系統 ( $BC_4$  世代) における花器官および葉の形態。大輪品種 ‘フルコン・ミッドブルー’ (遺伝子型 *Gg*) を、中輪の半数体倍加系統 ‘Mitchell’ (遺伝子型 *gg*) に戻し交雑した。A: 花。B: 萼。C: 雄蕊 (基部は花冠の筒と融合)。D: 心皮。E: 葉 (第5本葉)。各々の器官の写真で、左側は *gg*、右側は *Gg* 遺伝子型を示す。白の縦棒は 1 cm のスケールバー。

変異体で、花芽分裂組織が大型化し、ひいては花冠を含む花器官が大型化することが観察されている (Bartrina et al., 2011). ただし、前述のように、ペチュニアには、まだ単離されていない *CKX* のパラログが複数存在することが予想されるため、どれが花芽分裂組織および花冠で働いている主要な遺伝子であるのかを解明した上で、突然変異により、コードするタンパク質の機能が低下した遺伝子や、サイトカイニンシグナルによって発現誘導される機能が低下した遺伝子を複数検出し、さらにそれらを集積する育種が必要になるであろう。これは、今後の課題である。



第9図. *Grandiflora* (*G*) 遺伝子型が戻し交雑系統 ( $BC_4$ ) の器官の大きさと *PhCKX2* および *PhRR2* の発現に及ぼす影響。葉とその相同器官である莖、花弁、雄蕊、心皮を対象にした。遺伝子発現量を示す図 (中段および下段) では、灰色の棒が遺伝子型 *gg* を、白色の棒が遺伝子型 *Gg* を示す。面積増加率の測定には、それぞれ8個体ずつの遺伝子型 *gg* ならびに *Gg* の個体を供試した。葉は、第5本葉を供試した。雄蕊の面積は、向軸面の投影面積として測定した。心皮の面積は、柱頭と子房をそれぞれ円錐台とみなし、その側面の面積を算出した。誤差線は  $\pm$  SE ( $n=3$ )

サイトカイニン情報伝達系においては、タイプAレスポンスレギュレーター遺伝子の機能の低下がターゲットになる。シロイヌナズナにおけるタイプAレスポンスレギュレーター遺伝子のT-DNA挿入多重変異体では、外から与えたサイトカイニンへの反応が増強される (To et al., 2004)。これらの例では、花器官を含む器官の拡大は観察されていないものの、タイプAレスポンスレギュレーター遺伝子の機能低下によってサイトカイニン反応が増強されることが明確に示されている。ペチュニアの大輪品種では、タイプAレスポンスレギュレーター遺伝子の発現上昇を介して、花器官選択的にサイトカイニンシグナルへ負のフィードバックがかかっていることが示唆される (第7図)。したがって、*Gg* 遺伝子型においてタイプAレスポンスレギュレーター遺伝子が機能低下することにより、花器官で選択的にサイトカイニンシグナルが高まり、さらに花が大型化することが予想される。ペチュニアには、*Gg* 遺伝子型によって発現上昇せず、花の大型化によるフィードバック機能を失っているタイプAレスポンスレギュレーター遺伝子が存在する (Nishijima et al., 2011b)。前述のように、ペチュニアにはまだ単離されていないタイプAレスポンスレギュレーター遺伝子のパラログが複数存在することが予想される。そのため、サイトカイニン反応の増強のためには、機能欠損した複数の種類のタイプAレスポンスレギュレーター遺伝子を検出して集積することが必要である。これも、今後の課題である。

## 謝辞

本総説は、Nishijima, T. 2012. Large flower size: Molecular basis and role of cytokinin. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81(2): 129-139. を和訳、加筆、再構成したものである。筆者らの花の大型化の研究に関しては、農研機構花き研究所の仁木智哉氏、仁木朋子氏、黒部知子氏、青森県産業技術センター農林総合研究所の佐々木和也氏 (現青森県農林水産部)、岐阜県飛騨地域農業改良普及センターの宮木英有氏、東京都農林総合研究センターの岡澤立夫氏に多大なご協力をいただいた。ここに厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

Ando, T., M. Nomura, J. Tsukahara, H. Watanabe, H. Kokubun, T. Tsukamoto, G. Hashimoto, E. Marchesi and J. Kitching.

2001. Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Ann. Bot.* 88: 403-413.
- Bartrina, I., E. Otto, M. Strnad, T. Werner, and T. Schmillung. 2011. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 69-80.
- Bilyeu, K. D., J. L. Cole, J. G. Laskey, W. R. Riekhof, T. J. Esparza, M. D. Kramer and R. O. Morris. 2001. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiol.* 125: 378-386.
- Bossolini, E., U. Klahre, A. Brandenburg, D. Reinhardt, C. Kuhlemeier. 2011. High resolution linkage maps of the model organism *Petunia* reveal substantial synteny decay with the related genome of tomato. *Genome* 54: 327-340.
- Bowman, J. L., D. R. Smyth and E. M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 112: 1-20.
- Brand, U., J. C. Fletcher, M. Hobe, R. M. Meyerowitz and R. Simon. 2000. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289: 617-619.
- Brandstatter, I. and J. J. Kieber. 1998. Two genes with similarity to bacterial response regulators are rapidly and specifically induced by cytokinin in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1009-1019.
- Breuer, C., N. J. Stacey, G. Roberts, C. E. West, Y. Zhao, J. Chory, H. Tsukaya, Y. Azumi, A. Maxwell, K. Roberts and K. Sugimoto-Shirasu. 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3655-3668.
- Broholm, S. K., S. T. Htiharju, R. A. E. Laitinen, V. A. Albert, T. H. Teeri and P. Elomaa. 2008. A TCP domain transcription factor controls flower type specification along the radial axis of the *Gerbera* (Asteraceae) inflorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 9117-9122.
- Chapman, E. J. and M. Estelle. 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Ann. Rev. Genet.* 43: 265-285.
- Chen, C. M. and S. M. Kristpeit. 1981a. Metabolism of cytokinin: Dephosphorylation of cytokinin ribonucleotide by 5' -nucleotidases from wheat germ cytosol. *Plant Physiol.* 67: 494-498.
- Chen, C. M. and S. M. Kristpeit. 1981b. Metabolism of cytokinin: Deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cytosol. *Plant Physiol.* 68: 1020-1023.
- Clark, S. E., M. P. Running and E. M. Meyerowitz. 1993. *CLAVATA1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119: 397-418.
- Clark, S. E., M. P. Running and E. M. Meyerowitz. 1995. *CLAVATA3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *CLAVATA1*. *Development* 121: 2057-2067.
- Clark, S. E., R. W. Williams and E. M. Meyerowitz. 1997. The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89: 575-585.
- Coen, E. S. and E. M. Meyerowitz. 1991. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31-37.
- Coles, J. P., A. L. Phillips, S. J. Croker, R. Garcia-Lepe, M. J. Lewis and P. Hedden. 1999. Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J.* 17: 547-556.
- Davies, B., P. Motte, E. Keck, H. Saedler, H. Sommer and Z. Schwarz-Sommer. 1999. *PLENA* and *FARINELLI*: redundancy and regulatory interactions between two *Antirrhinum* MADS-box factors controlling flower development. *EMBO J.* 18: 4023-4034.
- Drews, G. N., J. L. Bowman and E. M. Meyerowitz. 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* 65: 991-1002.
- Ewart, L. 1984. Plant breeding. p. 180-253. In: K. C. Sink (ed.). *Petunia*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ferjani, A., S. Segami, G. Horiguchi, Y. Muto, M. Maeshima and H. Tsukaya. 2011. Keep an eye on PPI: The vacuolar type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase regulates postgerminative development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 2895-2908.
- Fletcher, J. C., U. Brand, M. P. Running, R. M. Simon and E. M. Meyerowitz. 1999. Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.
- Galliot, C. and M. E. Hoballah. 2006. Genetics of flower size and nector volume in *Petunia* pollination syndrome. *Planta* 225: 203-212.
- Gonzalez, N., S. de Bodt, R. Sulpice, Y. Jikumaru, E. Chae, S.

- Dhondt, T. van Daele, L. de Milde, D. Weigel, Y. Kamiya, M. Stitt, G. T. S. Beemster and D. Inzé. 2010. Increases leaf size: Different means to the end. *Plant Physiol.* 153: 1261-1279.
- Gordon, S. P., V. S. Chickarmane, C. Ohno and E. M. Meyerowitz. 2009. Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 16529-16534.
- Gustafson-Brown, C., B. Savidge and M. F. Yanofsky. 1994. Regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1*. *Cell* 76: 131-143.
- Hagiwara, T. 1956. Genes and chromosome maps in the Japanese morning glory. *Bull. Res. Coll. Agric. Vet. Sci., Nihon Univ.* 5: 34-56.
- Hou, B., E. K. Lim, G. S. Higgins and D. J. Bowles. 2004. N-Glycosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 279: 47822-47832.
- Hu, Y., Q. Xie and N. H. Chua. 2003. The auxin-inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* 15: 1951-1961.
- Huang, S., A. S. Raman, J. E. Ream, H. Fujiwara, R. E. Cerny and S. M. Brown. 1998. Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118: 773-781.
- Imamura, A., N. Hanaki, A. Nakamura, T. Suzuki, M. Taniguchi, T. Kiba, C. Uesugi, T. Sugiyama and T. Mizuno. 1999. Compilation and characterization of *Arabidopsis thaliana* response regulators implicated in His-Asp phosphorelay signal transduction. *Plant Cell Physiol.* 40: 733-742.
- Inoue, T., M. Higuchi, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, T. Kato, S. Tabata, K. Shinozaki and T. Kakimoto. 2001. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Kakimoto, T. 1996. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 274: 982-985.
- Kakimoto, T. 2001. Identification of plant cytokinin biosynthesis enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* 42: 677-685.
- Kiba, T., K. Aoki, H. Sakakibara and T. Mizuno. 2004. *Arabidopsis* response regulator, ARR22, ectopic expression of which results in phenotypes similar to the *wol* cytokinin-receptor mutant. *Plant Cell Physiol.* 45: 1063-1077.
- Kim, H. J., H. Ryu, S. H. Hong, H. R. Woo, P. O. Lim, I. C. Lee, J. Sheen, H. G. Nam and I. Hwang. 2006. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 814-819.
- Krizek, B. 1999. Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Dev. Genet.* 25: 224-236.
- Kurakawa, T., N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H. Sakakibara and J. Kozuka. 2007. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* 445: 652-655.
- Kuroha, T., H. Tokunaga, M. Kojima, N. Ueda, T. Ishida, S. Nagawa, H. Fukuda, K. Sugimoto and H. Sakakibara. 2009. Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3152-3169.
- Leibfried, A., J. P. C. To, W. Busch, A. Stehling, A. Kehle, M. Demar, J. J. Kieber and U. Lohmann. 2005. *WUSCHEL* control meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172-1175.
- Lenhard, M., A. Bohnert, G. Jurgens and T. Laux. 2001. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. *Cell* 105: 805-814.
- Li, J., H. Yang, W. A. Peer, G. Richter, J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwantakun, S. Undurraga, M. Khodakovskaya, E. L. Richards, B. Krizek, A. S. Murphy, S. Gilroy and R. Gaxiola. 2005. *Arabidopsis* H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. *Science* 310: 121-125.
- Lindsay, D. L., V. K. Vipan and P. C. Bonham-Smith. 2006. Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* 170: 1111-1117.
- Lohmann, J. U., R. L. Hong, M. Hobe, M. A. Busch, F. Parcy, R. Simon and D. Weigel. 2001. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105: 793-803.
- 松尾孝嶺. 1971. 育種学要論. 養賢堂. 東京.
- Mayer K. F., H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jurgens and T. Laux. 1998. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 95: 805-815.
- Melaragno, J. E., B. Mehrotra and A. W. Coleman. 1993. Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue



- of *Arabidopsis*. Plant Cell 5: 1661-1668.
- Mishiba, K., T. Ando, M. Mii, H. Watanabe, H. Kokubun, G. Hashimoto and E. Marchesi. 2000. Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). Ann. Bot. 85: 665-673.
- Mizukami, Y. and L. R. Fischer. 2000. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 942-947.
- Mizuno, T. 2005. Two-component phosphorelay signal transduction systems in plants: From hormone responses to circadian rhythms. Biosci. Biochem. Biotech. 69: 2263-2276.
- Niki, T., M. Hirai, T. Niki, A. Kanno and T. Nishijima. 2012. Role of floral homeotic genes in the morphology of forchlorfenuron-induced paracorollas in *Torenia fournieri* Lind. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 81: 204-212.
- 西島隆明. 2007. 花形. p. 37-43. 農山漁村文化協会編. 農業技術大系花き編 (追録9). 農山漁村文化協会. 東京.
- Nishijima, T., H. Miyaki, K. Sasaki and T. Okazawa. 2006. Cultivar and anatomical analysis of corolla enlargement of petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) by cytokinin application. Sci. Hortic. 111: 49-55.
- Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011a. Corolla of the Large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) cultivars exhibit low endogenous cytokinin concentration through enhanced expression of the genes encoding cytokinin oxidases. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 334-342.
- Nishijima, T., T. Niki and T. Niki. 2011b. The large-flowered petunia (*Petunia hybrida* Vilm.) genotype promotes expressions of type-A response regulator and cytokinin receptor genes like cytokinin response. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 80: 343-350.
- Nishijima, T. and K. Shima. 2006. Change in flower morphology of *Torenia fournieri* Lind. induced by forchlorfenuron application. Sci. Hortic. 109: 254-261.
- Nitasaka, E. 2007. Morphological mutants induced by transposable elements in the Japanese morning glory. Gamma Field Symp. 46: 73-78.
- 農林水産省. 2011. 花き生産出荷統計 (平成21年産). 農林統計協会. 東京.
- Oka, A. 2005. Cytokinin signal transduction and two-component regulatory system. Gamma Field Symp. 42: 25-39.
- Orlova, I., A. Marshall-Colón, J. Schnepp, B. Wood, M. Varbanova, E. Fridman, J. J. Blakeslee, W. A. Peer, A. S. Murphy, D. Rhodes, E. Picherdky and N. Dudareva. 2006. Reduction of benzenoid synthesis in petunia flowers reveals multiple pathways to benzoic acid and enhancement in auxin transport. Plant Cell 18: 3458-3475.
- Rashotte, A. M., S. D. B. Carson, J. P. C. To and J. J. Kieber. 2003. Expression profiling of cytokinin action in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 132: 1998-2011.
- Reddy, G. V. and E. M. Meyerowitz. 2005. Stem-cell homeostasis and growth dynamics can be uncoupled in the *Arabidopsis* shoot apex. Science 310: 663-667.
- 齋藤 清. 1959. 花の育種. 誠文堂新光社. 東京.
- Sakakibara, H. 2006. Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 431-449.
- 柴田道夫. 1995. キクの起源と日本への伝来. p. 7-8. 農山漁村文化協会編. 農業技術大系花き編 6. 農山漁村文化協会. 東京.
- Schmülling, T., T. Werner, M. Riefler, E. Krupkova and I. B. Manus. 2003. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. J. Plant Res. 116: 241-252.
- Schoof, H., M. Lenhard, A. Haecker, K. F. Mayer, G. Jurgens and T. Laux. 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. Cell 100: 635-644.
- Stock, A. M., V. L. Robinson and P. N. Goudreau. 2000. Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. 69: 183-215.
- Sweere, U., K. Eichenberg, J. Lohrmann, V. Mira-Ronado, I. Bäurle, J. Kudla, F. Nagy, E. Schäfer and K. Harter. 2001. Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signaling. Science 294: 1108-1111.
- 武田恭明. 1996. 栽培・育種の歴史. p. 7-11. 農山漁村文化協会編. 農業技術大系花き編 7. 農山漁村文化協会. 東京.
- Takei, K., H. Sakakibara and T. Sugiyama. 2001. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 276: 26405-26410.
- Talbert, P. B., H. T. Adler, D. W. Parks and L. Comai. 1995. The *REVOLUTA* gene is necessary for apical meristem development and for limiting cell divisions in the leaves and stems of *Arabidopsis thaliana*. Development 121: 2723-2735.

- Taniguchi, M., T. Kiba, H. Sakakibara, C. Ueguchi, T. Mizuno and T. Sugiyama. 1998. Expression of *Arabidopsis* response regulator homologs is induced by cytokinins and nitrate. FEBS Lett. 429: 259-262.
- To, J. P. C., G. Haberer, F. J. Ferreira, J. Deruere, M. G. Mason, G. E. Schaller, J. M. Alonso, J. R. Ecker and J. J. Kieber. 2004. Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. Plant Cell 16: 658-671.
- Ueguchi, C., H. Koizumi, T. Suzuki and T. Mizuno. 2001. Novel family of sensor histidine kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol. 42: 231-235.
- Venglat, S. P. and V. K. Sawhney. 1996. Benzylaminopurine induces phenocopies of floral meristem and organ identity mutants in wild-type *Arabidopsis* plants. Planta 198: 480-487.
- Verdonk, J. C., K. Shibuya, H. M. Loucas, T. A. Colquhoun, B. A. Underwood and D. G. Clark. 2008. Flower-specific expression of the *Agrobacterium tumefaciens isopentenyltransferase* gene results in radial expansion of floral organs in *Petunia hybrida*. Plant Biotech. J. 6: 694-701.
- Weiss, J., L. D. Benarroch and M. E. Cortines. 2005. Genetic control of flower size and proportions. Int. J. Dev. Biol. 49: 513-525.
- Werner, T., V. Motyka, V. Laucou, V. Smets, H. V. Onckelen and T. Schmüllung. 2003. Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. Plant Cell 15: 2532-2550.
- Werner, T., V. Motyka, M. Strnad and T. Schmüllung. 2001. Regulation of plant growth by cytokinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10487-10492.
- Yamaguchi, H., T. Niki, T. Niki and T. Nishijima. 2010. Morphological property and role of homeotic genes in paracorolla development of *Antirrhinum majus*. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 79: 192-199.
- 八代嘉明. 1994. 原産と来歴. p. 387-390. 農山漁村文化協会編. 農業技術大系花き編 8. 農山漁村文化協会. 東京.
- Zhao, Z., S. U. Andersen, K. Ljung, K. Dolezal, A. Miotk, S. J. Schultheiss and J. U. Lohmann. 2010. Hormonal control of the shoot stem-cell niche. Nature 465: 1089-1093.
- Zhong, R. and Z. H. Ye. 2001. Alteration of auxin polar transport in the *Arabidopsis ifl1* mutants. Plant Physiol. 126: 549-563.
- Zubko, E., C. J. Adams, I. Machackova, J. Malbeck, C. Scollan and P. Meyer. 2002. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants. Plant J. 29: 797-808.