

トマトの食味向上に向けた色素-フレーバー間の関連性解析

2023年1月
青野 佑亮

トマトの食味向上に向けた色素-フレーバー間の関連性解析

筑波大学大学院

理工情報生命学術院
生命地球科学研究群
農学学位プログラム
博士(農学)学位論文

青野 佑亮

略語リスト

GWAS: Genome wide association study

HPLC: High-performance liquid chromatography

MHO: 6-methyl-5-hepten-2-one

MPR: Microplate reader

PDA: Photodiode array detector

PSY1: Phytoene synthase 1

SNP: Single nucleotide polymorphism

VOC: Volatile organic compound

目次

第1章 序章	3
1.1 トマトの栽培化と品種改良	3
1.2 トマトのフレーバーに関する研究	3
1.3 アポカロテノイド香気成分とその生合成メカニズム	4
1.4 果実中クロロフィルと糖含量の関連性	6
1.5 Domestication Syndrome と野生種ゲノムの多様性	7
1.6 本研究の目的と意義	8
第2章 トマト 157 系統のカロテノイド・クロロフィル定量およびフレーバー化合物との統合解析	13
2.1 緒言	13
2.2 材料および方法	13
2.2.1 試薬	13
2.2.2 植物材料	14
2.2.3 マイクロプレートリーダーを用いたトマト果実中クロロフィル・カロテノイド含量の測定	15
2.2.4 HPLC-PDA を用いたカロテノイドの測定	16
2.3 結果	17
2.3.1 マイクロプレートリーダーによるカロテノイド・クロロフィル定量法の確立	17
2.3.2 トマト 157 系統の色素含量	18
2.3.3 色素含量とフレーバー関連化合物の定量	19
2.3.4 HPLC-PDA 分析による高 MHO 系統果実中の MHO 前駆体の探索	20
2.4 考察	21
2.4.1 果実中におけるクロロフィルと糖の関連性	22
2.4.2 高 MHO 系統におけるプロリコペンの蓄積	22
第3章 ゲノムワイド関連解析による色素含量関連遺伝子の探索	41
3.1 緒言	41
3.2 材料および方法	42
3.2.1 ゲノムワイド関連解析	42
3.2.2 GWAS 候補領域中遺伝子のマーカー間における示差的発現解析	42
3.3 結果	43
3.3.1 GWAS によるトマト染色体上のカロテノイド関連領域の検出	43
3.3.2 候補遺伝子群のマーカー間における発現の解析	44
3.4 考察	46
3.4.1 <i>PSY1</i> および隣接する遺伝子の発現	46
3.4.2 第5染色体上から選抜した候補遺伝子	46
総括	64
要旨	68
謝辞	71
引用文献	72

第1章 序章

1.1 トマトの栽培化と品種改良

トマトは世界中で広く栽培、消費が行われる経済的に最も重要な作物の1つであり、2020年には全世界で1億9千万トンが生産されている (FAO STAT, 2022)。

人類がいつトマトを栽培し始めたかは正確には明らかになっていない。しかし、近年の遺伝学的研究から、トマトの栽培化は以下に示すような2段階のプロセスがあったとみなされている。まずアンデス地域に自生する祖先種である *S. pimpinellifolium* が栽培化され、一般にチェリートマトと呼ばれる *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* が生まれた。その後、本種がメソアメリカ地域でさらなる選抜を受け、結果として現代の栽培種トマト *S. lycopersicum* が誕生し (Lin et al., 2014; Blanca et al., 2015)、その後コンキスタドールによって16世紀にヨーロッパに持ち帰られた (Jenkins, 1948)。しかし、トマトは当初毒草として知られており、食用としてみなされたのは18世紀以降だとされる。また、北アメリカにも運び込まれたトマトは19世紀以降に各地で品種改良が行われ、そこから多様な品種が世界中に広まったとされる (Bauchet and Causse, 2012)。現代では、多様な果実形状 (Tanksley, 2004) や果実色 (Coyago-cruz et al., 2019) を持つ多様なトマト品種が栽培され、市場に流通している。

1.2 トマトのフレーバーに関する研究

トマトの商品価値を決める要素は、果実サイズ、果実形状、色など様々であるが、主に食用として消費されるトマトにおいて、食味はその商品価値を決定づける因子として非常に重要である。食味の中心となるのはフレーバー、すなわち味覚と嗅覚の複雑な相互作用である (Zhu et al., 2019)。トマト果実のフレーバーは味覚で感知さ

れる種々の成分に加え、嗅覚で感知される香気成分も関与し、それらの相互作用によって決定される。味覚で感知される物質として、グルコースやフルクトースに代表される糖類、クエン酸、リンゴ酸に代表される有機酸、グルタミン酸やアスパラギン酸などのアミノ酸が挙げられる。嗅覚で検知されるのは種々の揮発性有機化合物 (Volatile organic compounds, VOCs) であり、トマトにおいては、果実中に存在する VOCs として 400 種類以上が同定されている (Quinet et al., 2019)。これら VOCs の中でも、実際に香気成分として機能し、フレーバーに重要とされているものは 20-30 種類程度であるとされている (Tieman et al., 2017; Zhu et al., 2019; Martina et al., 2021)。トマト果実中に存在する代表的な香気成分を表 1-1 に示す。これらの香気成分は果実成熟中における含量の変動パターンもそれぞれ異なり (Tikunov et al., 2010; Tieman et al., 2006; Ortiz-Serrano and Gil, 2010; Liscombe et al., 2022)、代謝物ごとに未成熟果実での捕食者の忌避、成熟果実での誘引など様々な役割を持つと考えられている (Rambla et al., 2014)。また、これらの香気成分の官能評価が進んでおり、それぞれの化合物が固有の香り、果実中濃度、嗅覚閾値を持つ (Klee, 2010)。総じて、これらのフレーバーに関わる化合物群の含量を制御することで、トマトのフレーバーを改善することができると考えられる。

1.3 アポカロテノイド香気成分とその生合成メカニズム

トマト果実中に存在する香気成分の中でも、ゲラニルアセトンや 6-メチル-5-ヘプテン-2-オン (MH0) などのアポカロテノイド香気成分は一般に *fruity/floral* と形容される甘い香りを呈し、これらの化合物が果実中に存在することで甘味の知覚が増強されることが示唆されている (Vogel et al., 2010)。果実中の糖含量と果実サイズはトレードオフの関係にあると言われている (Tieman et al., 2017) が、それを打ち破り収量と甘味を

両立することはトマトの高付加価値化に繋がる。そこで、アポカロテノイド香気成分のような甘い香りを呈する香気成分の生産を増強することで、果実にさらなる甘味を付加できる可能性がある。

アポカロテノイド香気成分は赤黄色色素であるカロテノイドを前駆体とする (Rambla et al., 2014)。代表的なアポカロテノイド香気成分およびその前駆体であるカロテノイドの生合成経路を図 1-1 に示す。トマト果実の成熟過程における爆発的なカロテノイド合成は色素体内で行われるが、その際にカロテノイドの前駆体となるゲラニルゲラニルピロリン酸 (GGPP) は非メバロン酸経路から供給される (Cazzonelli and Pogson, 2010)。2分子の GGPP が縮合することでフィトエンが合成され、これが続く多段階の不飽和化と異性化を受け、中間体である ζ -カロテンを経由してリコペンに変換される。また、リコペンは酵素反応により β -カロテン等の環化カロテンにも変換される (三沢, 2015)。最終的に、これらのカロテノイドは主にカロテノイド開裂酵素 (CCD) の作用による酸化的開裂を受け、 ζ -カロテンからゲラニルアセトンが、リコペンから MH0 が、 β -カロテンから β -イオノンがそれぞれ生じる (Vogel et al., 2008)。

アポカロテノイド香気成分の含量は、前駆体であるカロテノイド含量の影響を受ける可能性が示唆されている。Simkin らはトマト果実で発現しカロテノイド切断酵素をコードする *CCD1* 遺伝子が未成熟果実でも発現していることを明らかにした (Simkin et al., 2004)。このことから、成熟に伴いカロテノイドが増加し前駆体が供給されることがアポカロテノイド香気成分の生合成量増加に重要であると述べられている (Klee, 2010)。また、別の先行研究 (Vogel et al., 2010) では各種カロテノイド酵素遺伝子

の機能欠損変異体を用いて、カロテノイド含量・香気成分含量および糖・有機酸含量などトマトの食味に関わる形質が解析された。各遺伝子型間の比較から、カロテノイド含量やアポカロテノイド香気成分が変異に応じて変動することが明らかとなった。また、一部変異体ではアポカロテノイド以外の香気成分についても、野生型と比べて有意に増減することが確認された。

加えて、Tiemanらは、栽培種および野生種の計398系統をゲノムワイド関連解析に供し、ゲラニルアセトンとMH0に関連するゲノム領域を絞り込んだ (Tieman et al., 2017)。しかし、実際にそれらの含量を制御する遺伝子の同定には至っていない。

このように、アポカロテノイド香気成分の生合成経路や、生合成に関わる酵素については既に明らかになっている。しかしながら、その含量の制御や、含量の品種間差を作り出す遺伝子やメカニズムについては十分に理解されていない。

1.4 果実中クロロフィルと糖含量の関連性

トマト果実に含まれる糖類の大半は葉からの転流に由来する (Cocaliadis et al., 2014) とされる一方で、果実自身にも葉の20%弱程度の光合成活性が存在するといわれており (Hetherington et al., 1998)、果実中の糖類の一部は果実で合成される可能性が指摘されている。

また、果実の成熟が進行してもヘタの周囲で葉緑体およびクロロフィル含有量が維持されるために緑色の領域が残る“Green shoulder”と呼ばれる形質が存在する。先行研究にて、この Green shoulder 形質の原因遺伝子である *SIGLK2* の過剰発現が、未熟果実におけるクロロフィル含量の増大、および

成熟果実中のグルコースとフルクトースの含量の増加を引き起こすことが明らかになったため、本形質の有無が糖含量の品種間差に関与していると考えられている (Powell et al., 2012)。一方、多くの現代品種では *SIGLK2* の機能欠損型アレルによって生じる “Uniform ripening” 形質を持ち、均一に赤く色づく果実と引き換えに糖含量が減少したとみなされている (Folta and Klee, 2016)。

1.5 Domestication Syndrome と野生種ゲノムの多様性

先述の通り、トマトは南米からメソアメリカ地域を経てヨーロッパおよび北アメリカに持ち込まれたが、この過程で強い選抜を受けて遺伝的多様性が著しく減少したとされている (Bai and Lindhout, 2007)。

一般に、植物の栽培化の過程において、遺伝子は人為的な強い選抜を受ける。その結果、祖先種と栽培種とでは明確に異なる表現型を持つ。典型的な例として、可食部の肥大や収量の増加などが挙げられ、この現象は “Domestication syndrome” と呼ばれる (Doebley et al., 2006)。特に、トマトでは果実の食用化、均一な赤い着色、果実の肥大化といった形質が好まれて選抜されてきた (Bauchet and Causse, 2012)。その代償として、風味に関する諸形質は選抜の際に無視され、トマト果実の風味は著しく損なわれたと考えられている (Klee, 2010)。

一方で、野生種トマトにおいては先述した選抜を受けなかったために、遺伝的多様性が保存されている (Aflitos et al., 2014)。「トマト」は、現在栽培種として用いられている *S. lycopersicum* に加えて、*S. pimpinellifolium* などの十数種の近縁野生種トマトを含む *Lycopersicon* clade を形成する (Moyle, 2008)。うち数種は栽培種 *S. lycopersicum* との交配が可能である。これら野生種の生息地はアンデス山脈から南アメリカ大陸北西部の沿岸地域にまで及び、その生息域の気候も標高の高い乾燥

地域や熱帯雨林など様々である (Moyle, 2008)。これら野生種の遺伝的なプールは非常に多様であり、栽培種よりも高い生物的・非生物的ストレスへの耐性 (Bolger et al., 2014) といった、有用な形質が数多く存在すると考えられている。そのため、野生種トマトは遺伝資源としての可能性が注目されており、野生近縁種から栽培種の遺伝子移入に焦点を当てた研究が数多く行われている (Bai and Lindhout, 2007)。

ストレス耐性のような栽培上有用な形質だけでなく、果実色や味、香りといった商業的形質についても、同様に栽培種・野生種を含む大規模なトマト集団を用いた遺伝学的解析が行われてきた。Zhuらは、トマトの栽培化や育種改良における選抜に焦点を合わせ、実際に選抜されてきた遺伝子の推定とそれに伴う表現型や代謝物の変動を明らかにした (Zhu et al., 2018)。Gaoらは、*S. lycopersicum* や *S. pimpinellifolium* に加え、*Lycopersicon* clade に属する *S. cheesmaniae* と *S. galapagense* のシーケンシングを行ってトマトのパンゲノムを構築した。その結果、脂肪酸由来香気成分の含量制御に寄与する *TomLoxC* の新規アレルを含め、リファレンスとして頻用される品種である“Heinz 1706”のゲノム上に存在しない4873の遺伝子を新たに同定した (Gao et al., 2019)。

1.6 本研究の目的と意義

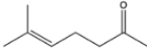
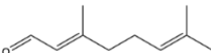
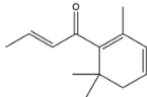
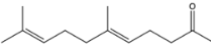
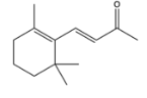
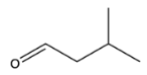
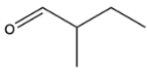
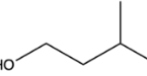
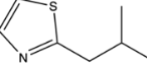
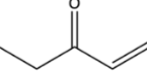
ここまで述べてきたように、官能評価などを通じてトマト果実中に存在する化合物のフレーバーへの寄与の程度が研究され、トマトのフレーバー形成に重要な化合物群が明らかになりつつある。また、トマトのフレーバー改善を目指して、それらの重要化合物の含量制御メカニズムの研究や、栽培種・野生種を対象とした有用遺伝子の探索が行われ、実際に香気成分の含量に関わる新規遺伝子の同定が進んでいる。それにも関わらず、甘い香りを呈しトマトの甘味を増強する化合物の一種であるアポカロテノイド香気成分の含量を制御する遺伝子に関する知見は未だ不十分であり、その含

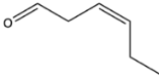
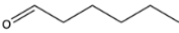
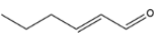
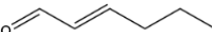
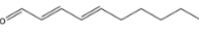
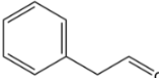
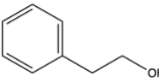
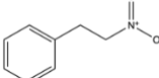
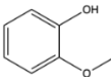
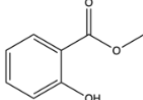
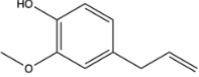
量改善のためにはさらなる解析が必要である。

そこで本研究では、アポカロテノイド香気成分の前駆体であるカロテノイドに着目し、アポカロテノイド香気成分の量的・質的關係を解析することで含量制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

また、光合成に関与し、果実中の糖含量にも寄与しうるクロロフィルはカロテノイドとの同時分析が可能なため、こちらにも着目し、カロテノイドと併せて分析を行うこととした。これら色素と糖類および香気成分の量的・質的關係を解析することで、色素含量の増減が食味に与える影響を明らかにすることを目的とした。最終的には定量化に供したトマトのゲノム解析を行い、色素含量の制御を通じてフレーバーを改善しうる遺伝子の同定を目的とした。

表 1-1 トマト果実中に存在する代表的な香気成分

分類	化合物	構造	香気の性質 (flavor description)	果実成熟中の 含量動態	参考文献
アポカロ テノイド (カロテノ イド由来)	6-Methyl-5- hepten-2- one		Citrus, green, musty, lemongrass, apple	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Ortiz-Serrano and Gil (2010), Tieman et al (2006)
アポカロ テノイド (カロテノ イド由来)	Geranial		Sharp, lemon, sweet		Martina et al (2021)
アポカロ テノイド (カロテノ イド由来)	β - Damascenone		Apple, rose, honey, tobacco, sweet		Martina et al (2021)
アポカロ テノイド (カロテノ イド由来)	Geranylacet one		Fresh, green, fruity, waxy, rose, woody, magnolia, tropical	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
アポカロ テノイド (カロテノ イド由来)	β -Ionone		Floral, woody, sweet, fruity, berry, tropical, beeswax	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Ortiz-Serrano and Gil (2010), Tieman et al (2006)
分枝鎖ア ミノ酸由 来	3- Methylbutan al		Ethereal, aldehydic, chocolate, peach, fatty	ターニング期に 最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
分枝鎖ア ミノ酸由 来	2- Methylbutan al		Musty, cocoa, coffee, nutty	催色期以降で最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
分枝鎖ア ミノ酸由 来	3- Methylbutan ol		Fusel, oil, alcoholic, whiskey, fruity, banana	ターニング期に 最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
分枝鎖ア ミノ酸由 来	2- Isobutylthi azole		Green, wasabi, privet, tomato, leaf, earthy, vegetable, metallic	“Moneymaker” で は赤熟期に最大 (Ortiz-Serrano and Gil., 2010) “M82” では成熟に 従い減少 (Tieman et al., 2006)	Martina et al (2021), Ortiz-Serrano and Gil (2010), Tieman et al (2006)
脂肪酸由 来	1-Penten-3- one		Pungent, peppery, mustard, garlic, onion		Martina et al (2021)

脂肪酸由来	(Z)-3-Hexenal		Green, fatty, grassy, weedy, fruity, apple	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Ortiz-Serrano and Gil (2010), Tieman et al (2006)
脂肪酸由来	Hexanal		Sweet, almond, fruity, green, leafy, apple, plum, vegetable	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Ortiz-Serrano and Gil (2010)
脂肪酸由来	(E)-2-Hexenal		Sharp, fresh, leafy, green, clean, fruity, spicy, herbal	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
脂肪酸由来	(E)-2-Heptenal		Pungent, green, vegetable, fresh, fatty	催色期以降で最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
脂肪酸由来	(E,E)-2,4-Decadienal		Oily, cucumber, melon, citrus, pumpkin, nut, meat		Martina et al (2021)
フェノール化合物	Phenylacetaldehyde		Green, sweet, floral, hyacinth, clover, honey, cocoa	特定の パターンなし	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
フェノール化合物	2-Phenylethanol		Sweet, floral, fresh, bread, rose, honey	催色期以降で最大	Martina et al (2021), Tieman et al (2006)
フェノール化合物	1-Nitro-2-phenylethanol		Flower, spice	赤熟期に最大	Martina et al (2021), Liscombe et al (2022)
フェニルプロパノイド	Guaiacol		Phenolic, smoke, spice, vanilla, woody	"Smokey"品種では成熟段階に関わらず存在 "Non-smokey"品種では成熟に従い減少	Martina et al (2021), Tikunov et al (2010)
フェニルプロパノイド	Methyl salicylate		Wintergreen, mint	"Smokey"品種では成熟段階に関わらず存在 "Non-smokey"品種では成熟に従い減少	Martina et al (2021), Tikunov et al (2010)
フェニルプロパノイド	Eugenol		Sweet, spicy, clove, woody	"Smokey"品種では成熟進行に従い増加 "Non-smokey"品種では成熟に従い減少	Martina et al (2021), Tikunov et al (2010)

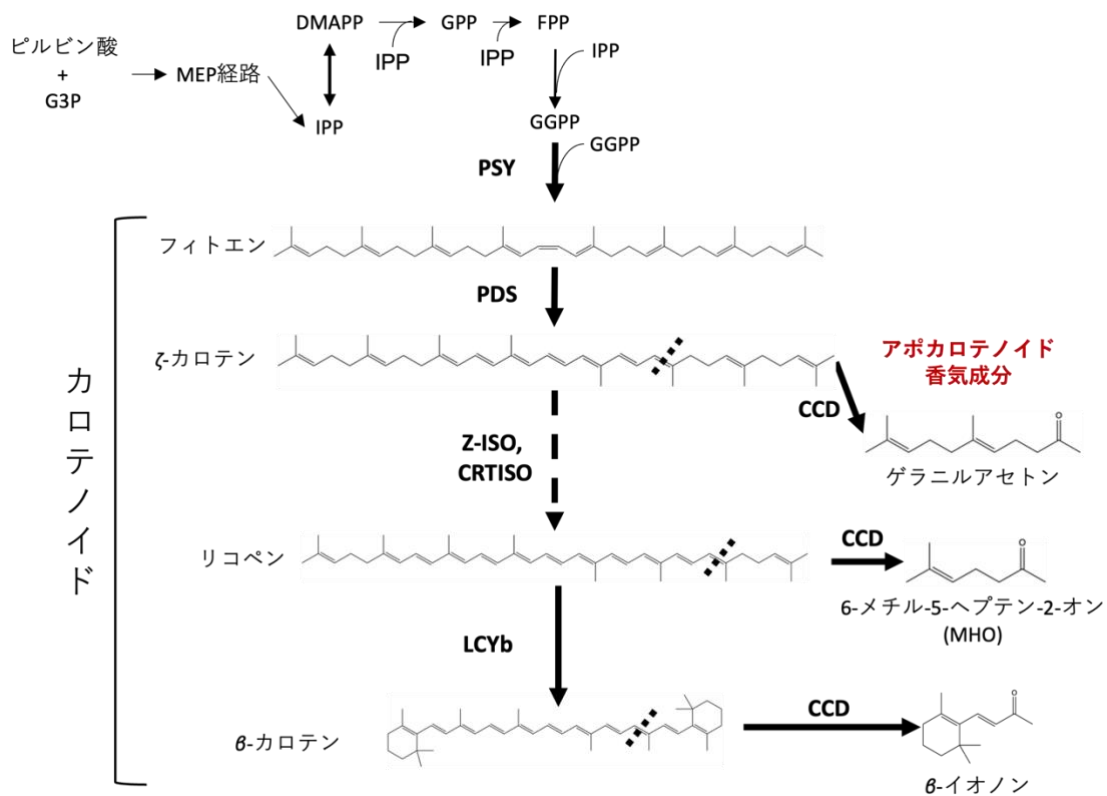


図 1-1 カロテノイドとアポカロテノイド香気成分の生合成経路

G3P: グリセルアルデヒド-3-リン酸、MEP: 2-C-メチル-D-エリトリトール-4-リン酸、
 DMAPP: ジメチルアリルピロリン酸、IPP: イソペンテルニリン酸、GPP: ゲラニルニ
 リン酸、FPP: ファルネシルニリン酸、GGPP: ゲラニルゲラニルニリン酸、PSY: フィ
 トエン合成酵素、PDS: フィトエン不飽和化酵素、Z-ISO: ζ-カロテン異性化酵素、
 CRTISO: カロテン異性化酵素、LCYb: リコペンβ-環化酵素、CCD: カロテ
 ノイド酸化開裂酵素

図中点線は CCD による開裂部位を示す。実践の矢印は一段階の反応を、点線の矢印は
 複数の中間体を經由する多段階の不飽和化と異性化の反応をそれぞれ示す。

第2章 トマト 157 系統のカロテノイド・クロロフィル定量およびフレーバー化合物との統合解析

2.1 緒言

第 1 章で述べたように、アポカロテノイド香气成分の含量制御に関する知見は乏しい。加えて、トマトの果実中クロロフィルと糖含量の結びつきは十分に理解されていない。そこで、これらの色素がアポカロテノイド香气成分や糖類の果実中含量に与える影響を明らかにするために、本研究では栽培種である *S. lycopersicum* および交配可能な野生種 362 系統について、果実中クロロフィルおよびカロテノイド含量を測定した。うち 157 系統について過去に測定された糖および香气成分の含量と組み合わせ両者の量的関係を解析した。解析の結果、クロロフィルの果実中含量が上位 10%の系統で下位 10%よりもグルコースとフルクトースの含量が有意に高いことが示され、果実中におけるクロロフィルと糖類の関連性が示唆された。また、高 MHO 系統 “Dixie Golden Giant” において、一般のトマトの赤熟期果実に蓄積する *all-trans* 型のリコペンに代わり、その *cis* 異性体であるプロリコペンが MHO 前駆体として働く可能性が示唆された (Aono et al., 2021)。

2.2 材料および方法

2.2.1 試薬

実験に使用した溶媒はすべて富士フィルム和光純薬（東京、日本）製のものを用いた。マイクロプレートリーダー分析にはアセトン（特級）を用いた。HPLC-PDA 分析にて使用した抽出溶媒にはメタノール（LC-MS グレード）、水（LC-MS グレード）、クロロホルム（HPLC グレード）を用いた。移動相にはメタノール（LC-MS グレード）、水（LC-MS グレード）、ヘキサン（HPLC グレード）、2-プロパノール（HPLC グレード）を

用いた。

HPLC-PDA分析でリコペン、 β -カロテン、クロロフィルaの同定に用いた標準品は、富士フィルム和光純薬製のものを用いた。クロロフィルbおよび *trans*- β -アポ-8'-カロテナールは Sigma-Aldrich (MO, U.S.) より購入した。ルテインは EXTRASYNTHÈSE (Genay, France) より購入した。

2.2.2 植物材料

栽培種トマト (*S. lycopersicum*) 系統 “Micro-Tom”、“Ailsa Craig”、“Moneymaker” は筑波大学 つくば機能植物イノベーション研究センター (T-PIRC) 遺伝子実験センター内の屋外温室にて栽培および収穫を行った。“Micro-Tom” は自然光に加え補光 (16:30-22:00) 下での栽培を行った。“Ailsa Craig” と “Moneymaker” は自然光のみで栽培した。いずれの系統も開花後はハイポネックス (ハイポネックス ジャパン、大阪、日本) を週1回与えた。

果実は “USDA Visual Aid TM-L-1” (USDA Agri-cultural Marketing Service, 1975) に従い、緑熟期 (MG: Mature Green)、催色期 (BR: Breaker) および赤熟期 (RR: Ripen red) の3段階を収穫した。収穫した各果実は、赤道面の3点について色度計 (CM-700d, コニカミノルタ、日本、東京) を用いて表色を測定し、 $L^*a^*b^*$ 値として記録した。その後、種子およびゼリー一部を除いて48時間の凍結乾燥を行い、分析まで -80°C で保存した。

クロロフィル・カロテノイド測定に供したトマト (栽培種 *S. lycopersicum* および近縁野生種 *S. l. ver. cerasiforme* と *S. pimpinellifolium*) はフロリダ大学 North Florida Research and Education Center-Suwannee Valley の屋外温室にて栽培した。赤熟期果実を収穫後、48時間の凍結乾燥を行い、分析まで -80°C で保存した。

2.2.3 マイクロプレートリーダーを用いたトマト果実中クロロフィル・カロテノイド含量の測定

-80°C で保存した粉碎済み凍結乾燥果実サンプルを、分析前に室温にして約 1 時間静置した。サンプル 2 mg を 3 mm ジルコニアビーズ（ニッカトー、大阪、日本）入りの 1.5 mL サンプリングチューブ（Sarstedt、Nümbrecht、Germany）に秤量し、抽出溶媒としてアセトン を 400 μ L 加えた。その後、TissueLyserII（Qiagen、Venlo、Netherlands）を用いて 15 Hz で 10 分間震盪し、遠心分離機（ST 8FR、Thermo Fisher Scientific、MA、U.S.）で遠心分離（15000 rpm、5 分、20 °C）を行った。続いて、上澄を別のサンプリングチューブに移し替え、氷上に静置した。同様の操作をもう一度行い、得られた合計約 700 μ L の上澄をよく混合した。

上澄 300 μ L を 96 穴ガラスプレート（日計製作所、大阪、日本）に分注し、マイクロプレートリーダー（Infinite M200Pro、Tecan、Männedorf、Switzerland）を用いて吸光度測定を行った。吸光度 663、647、470、506、750 nm ($\leq \pm 1.5$ nm) を測定し、以下の式で光路長の補正と懸濁による波長非特異的な散乱の補正を行い、光路長 1 cm 相当の吸光度（以下「吸光度」とする）を算出した。

$$A_x = (OD_x - OD_{750}) / l \quad (1)$$

(A_x : x nm における吸光度; OD_x : x nm における光学密度; l : 使用したガラスプレートの光路長 (= 0.876887 cm))

得られた吸光度と、過去の文献 (Lichtenthaler and Buschmann, 2001; Ito and Horie, 2009) を元に作成した以下の式を用いて、クロロフィルとカロテノイドの含量を算出した。

$$\text{Chl a (mg/g DW): } Ca = (11.24 A_{662} - 2.04 A_{645}) \times (v/w) \quad (2)$$

$$\text{Chl b (mg/g DW): } Cb = (20.13 A_{645} - 4.19 A_{662}) \times (v/w) \quad (3)$$

$$\text{Total Carotenoids (mg/g DW) = } \{(1000 A_{470} - 1.90 Ca - 63.14 Cb) / 214\} \times (v/w) \quad (4)$$

$$\text{Lycopene (mg/g DW) = } (A_{506} / 315) \times (v/w) \quad (5)$$

A_x : x nm における吸光度; v : 溶媒の体積 (mL); w : サンプル重量 (mg)

2.2.4 HPLC-PDA を用いたカロテノイドの測定

一部のトマト系統については、果実中のカロテノイド組成の違いを明らかにするために、HPLC-PDA を用いた測定に供した。

カロテノイドの抽出は先行研究 (Kimbara et al., 2013) の方法を一部改変して実施した。凍結乾燥果実を常温で1時間静置した後、3 mm ジルコニアビーズ入りの1.5 mL サンプリングチューブ (ザルスタット) に7-8 mg 秤量した。ここに抽出溶媒 (内部標準物質として 12 μ M *trans*- β -アポ-8'-カロテナール を含むクロロホルム:メタノール=1:1 (v/v)) 1155 μ L を添加し、TissueLyser II (Quiagen, Hilden, Germany) を用いて 8 Hz の震とうを5分間、室温にて行い色素を抽出した。さらに水 196 μ L を添加して 13000 \times g で10分間の遠心分離を行った。ここから 1000 μ L の上澄を回収し、240 μ L の水を加えた。2時間静置して二層に分離したことを確認した後、4°C で 1000 \times g の遠心分離を10分間行った。その後、有機層 340 μ L を、SpeedVac (SPD2010, Thermo Fisher Scientific) を用いて濃縮乾固した。乾固したサンプルにエタノール/クロロホルム (1:1, v/v) 81 μ L を加え、8 Hz、5分間の震とうと2分間の超音波処理 (CPX1800-J, Branson Ultrasonics, CT, U.S.) を行って再溶解した。4°C で 17800

× g の遠心分離を 15 分間行った後、60 μ L を 250 μ L ガラス製インサートバイアル (Agilent Technologies、CA、U.S.) に採取し分注し分析サンプルとした。

HPLC-PDA 分析には Prominence UFLC システム (島津製作所、京都、日本) を用いた。カラムは Develosil C30-UG-5 (2.0 mm I.D.、250 mm long) (野村化学、愛知、日本) を使用し、移動相として A (メタノール/水(95:5)、0.1% トリエチルアミン) と B (ヘキサン/イソプロピルアルコール(60:40, v/v, 0.1% トリエチルアミン) の 2 種類を用いてグラジエント分析を行った。タイムプログラムは表 2-1 の通りとし、カラムオープン内の温度は 30°C とした。検出にはフォトダイオードアレイ検出器 (SPD-M20AD、島津製作所) を使用し、200-800 nm における吸光度を記録した。カロテノイドおよびクロロフィルの定量に用いるピーク高さは、450 nm と 650 nm で描画したクロマトグラムを元に計算した。ピークの同定は標準品 (クロロフィル a および b、 β -カロテン、ルテイン、リコペン) との保持時間および吸光スペクトルの比較を元に行った。

2.3 結果

2.3.1 マイクロプレートリーダーによるカロテノイド・クロロフィル定量法の確立

多検体のサンプルでのカロテノイドとクロロフィルの定量を迅速に達成するため、本研究ではマイクロプレートリーダーを用いた定量法の最適化を行った (図 2-1)。本方法では、アセトンを用いた一層抽出法を採用した。これは、トマト果実中には、カロテノイド・クロロフィルが主に吸光を示す 450-700 nm 付近に吸収を持つ夾雑物がほとんど存在しないと考えられ、二層抽出による夾雑物除去を行う必要がないためである (Lichtenthaler and Buschmann, 2001)。また、分光光度計を用いたクロロフィル分析法には 80%アセトンが広く用いられているが、80%アセトンに対するリコペンの

溶解度が低く十分な抽出が行えなかったため、本研究では抽出液として100%アセトンを採用した。

次に、クロロフィルおよびカロテノイドの標準品溶液と希釈系列を測定し、本測定系における各色素の定量下限値を決定した。各定量値および希釈倍率のプロットを図 2-2 に示す。この結果から、クロロフィル a および b、カロテノイド総量、リコペン含量の検出下限値をそれぞれ 0.029、0.12、0.05、0.071 $\mu\text{L}/\text{mL}$ と定めた。

また、マイクロプレートリーダーと HPLC-PDA の双方で同一トマトサンプルのクロロフィル・カロテノイド含量を測定し、相関係数を算出した。結果を図 2-3 に示す。各測定法による定量値の相関係数はいずれも $R^2 > 0.8$ であったため、本研究で用いるにあたり十分な精度を確認できた。本方法では 1 サンプルあたり約 10 秒で各色素を同時に定量でき、HPLC-PDA 法と比べて大幅に分析時間を短縮することができた。

2.3.2 トマト 157 系統の色素含量

果実中色素とフレーバーの関連性を評価するために、本研究ではまず栽培種・野生種トマト集団の果実中クロロフィル・カロテノイドの定量を行った。

また、果皮色と色素含量の対応を確認するために、研究材料として頻繁に用いられる “Ailsa Craig”、“Moneymaker”、“Micro-Tom” の 3 系統について、成熟段階ごとのクロロフィルとカロテノイドの果実中含量を測定した (図 2-4)。

先行研究 (Tieman et al., 2017) にて糖および香気成分の含量が得られている 157 系統について、各色素の含量を図 2-5 および表 2-2 に示す。157 系統のうち 142 系統において、“Ailsa Craig”、“Micro-Tom”、“Moneymaker” の例 (図 2-4) と同様に、カロテノイド総量の 50% 以上のリコペン含量を示した。一方で、リコペン含量の低い系統 (カロテノイド総量の 40% 以下) が 12 系統存在した (TS-25 (Clémentine)、TS-27 (N135 Green Gage)、TS-63、TS-75 (Poire jaune)、TS-120 (Lee Williams)、TS-165

(Veracruz)、TS-209 (Da serbo)、TS-213、TS-293 (Green Zebra)、TS-513 (Dixie Golden Giant)、TS-528 (Lemon Drop)、TS-600 (Kellogg's Breakfast))。カロテノイド総量とリコペン含量のどちらにおいても、クロロフィルaまたはクロロフィルbとの間に相関は見られなかった (Data not shown)。

2.3.3 色素含量とフレーバー関連化合物の定量

果実中の色素含量とフレーバー関連化合物の関連性を確認するために、本研究にて測定した色素含量の定量値を、先行研究 (Tieman et al., 2017) にて得られた糖含量および香気成分含量と照らし合わせた。その結果、両者で共通する 157 系統のうち、“Bear Creek”を除く 156 系統について、可溶性固形分 (Brix %)、グルコース、フルクトースおよび香気成分の含量が得られた。

まず、光合成に着目し、糖生産において中心的な役割を担うクロロフィルに関して、含量上位 10%と下位 10%の系統の糖含量を比較した。先行研究 (Tieman et al, 2017) にてグルコースとフルクトースの含量が測定された系統のうち、本研究にてクロロフィル含量が得られた全 156 系統 (A11) および上位 10% (high-Chl, 16 系統)、下位 10% (low-Chl, 16 系統) での含量を図 2-6 (a)および(b)にそれぞれ示す。クロロフィル含量上位 10%の系統において、下位 10%の系統よりも有意に糖含量が高いことが示された ($p < 0.05$)。

カロテノイド分解物であるゲラニルアセトンおよび MH0 についても同様にカロテノイド総量とリコペンの上位・下位 10%系統の含量比較を行った。先行研究 (Tieman et al, 2017) にてゲラニルアセトンと MH0 の含量が測定された系統のうち、本研究にてカロテノイド総量が得られた全 157 系統 (A11) および上位 10% (high-Car, 16 系統)、下位 10% (low-Car, 16 系統) の含量を図 2-6 (c)および(d)にそれぞれ示す。前駆体

であるカロテノイド含量が低いことを反映して、カロテノイド総量下位 10%である 16 系統 (TS-25 (Clémentine)、TS-27 (N135 Green Gage)、TS-63、TS-75 (Poire jaune)、TS-120 (Lee Williams)、TS-165 (Veracruz)、TS-209 (Da serbo)、TS-213、TS-234 (Red Streak)、TS-250 (Yellow cherry)、TS-271 (Linosa)、TS-293 (Green Zebra)、TS-450 (my)、TS-509 (Clear Pink Slicer)、TS-513 (Dixie Golden Giant)、TS-523 (Hillbilly)、TS-528 (Lemon Drop)、TS-600 (Kellogg's Breakfast)) のうち、ゲラニルアセトンに関しては TS-120 (Lee Williams)、TS-513 (Dixie Golden Giant)、TS-600 (Kellogg's Breakfast) を除く 13 系統で、MHO に関しては TS-513 (Dixie Golden Giant) と TS-600 (Kellogg's Breakfast) を除く 14 系統で 157 系統の平均を下回った。

一方、157 系統中で最も高いゲラニルアセトン含量および MHO 含量を示した TS-513 (Dixie Golden Giant) および TS-600 (Kellogg's Breakfast) は、いずれもカロテノイド含量下位 10% であり、いずれの香気成分についても 157 系統平均の 5 倍以上の含量を示した。

2.3.4 HPLC-PDA 分析による高 MHO 系統果実中の MHO 前駆体の探索

先述の結果を踏まえ、高 MHO 系統の果実における MHO 前駆体を同定すべく、HPLC-PDA を用いて “Dixie Golden Giant” の果実のカロテノイド組成を分析した。比較のため、標準的な赤色果実を示す “Ailsa Craig” に加え、高 MHO 系統と同様にカロテノイド総量下位 10% 系統でありリコペンを蓄積しない “Green Zebra” や “N135 Green Gage”、“Lemon Drop”、“Poire Janue”、リコペンとクロロフィルの双方を蓄積する “Bear Creek” および “Chocolate Cherry” の、カロテノイド代謝が異なる可能性のある 8 系統を選択し分析に供した。なお、高 MHO 系統 “Kellogg's Breakfast” はサンプルが十分に得られなかったため解析から除外した。得られた HPLC クロマトグラ

ムを図 2-7 に示す。検出されたピークのうち、リコペン、 β -カロテン、リコペンの 3 種類が標準品を用いて同定された。8 種類が 400-500 nm に吸収を持つカロテノイド様ピーク、5 種類は非カロテノイドピークとして推定された。

先述のカロテノイド分析の結果と同様に、“Ailsa Craig”ではリコペンのピークが顕著に見られ、 β -カロテン、ルテインのピーク、および他 7 種の未同定カロテノイド様ピークが検出された。茶色の果実を持ちクロロフィルとリコペンの双方を蓄積する “Bear Creek” と “Chocolate Cherry” についても、“Ailsa Craig” に類似したクロマトグラムが得られた。一方、“Green Zebra” や “N135 Green Gage” ではそのような傾向が見られず、カロテノイド由来のピークは検出されなかった。

高 MH0 系統である “Dixie Golden Giant” では、本来 MH0 の前駆体であるリコペンに由来するピークは検出されず、他系統には見られない特異的なピーク（番号 9）のみが検出された。本ピークの UV スペクトルを図 2-8 に示す。先行研究（Fraser et al., 2000; Isaacson et al., 2002; Yoo et al., 2020）との比較により、本ピークはリコペンの前駆体で *tetra-cis* 体であるプロリコペンであると推定された。理由として、本研究で得られた UV スペクトルが先行研究でのプロリコペンのスペクトルに類似することに加え、*all-trans* リコペンと比較して UV 吸収ピークが短波長にシフトしていること、および逆相 HPLC において *all-trans* リコペンよりも早く溶出することといった特徴が本研究でも確認できたことが挙げられる。これらの結果より、“Dixie Golden Giant” 果実中には一般的な赤色トマトにおいて MH0 前駆体として機能する *all-trans* 型のリコペンが蓄積せず、クロマトグラム中に唯一存在するカロテノイドであるプロリコペンが MH0 の前駆体として機能している可能性が示唆された。

2.4 考察

2.4.1 果実中におけるクロロフィルと糖の関連性

トマト 157 系統の果実中クロロフィル定量結果と糖含量のデータを統合した結果、クロロフィル含量の上位 10%系統の糖含量の平均が、下位 10%よりも有意に高いことが明らかになった。本結果から、果実中クロロフィルの存在が糖含量に影響する可能性が考えられる。考えられるメカニズムとして、第 1 章で述べた *SIGLK2* 遺伝子の関与が考えられる。先行研究 (Nguyen et al., 2014) において、機能型 *SIGLK2* を過剰発現したトマトの未成熟果実では光合成関連遺伝子や葉緑体の発達に関わる遺伝子の発現上昇が見られ、また未成熟果実の葉緑体数、グラナあたりのチラコイド数、クロロフィル含量の増加と成熟果実のグルコース、フルクトース含量の増加が認められた。また、*SIGLK2* の過剰発現は葉のクロロフィル含量には影響しなかった。このことから、機能型 *SIGLK2* は葉緑体とチラコイドの増加を通じて果実の光合成能力を増強し、果実の糖生産を増加させると考えられている。

本研究で得られた結果は機能型 *SIGLK2* が果実中糖含量の増加に関与する説を支持すると考えられる。機能型 *SIGLK2* を持つトマト未成熟果実におけるヘタ周りの濃い緑色の着色を示し、また成熟果実にも緑色が残存する **Green shoulder** 形質を引き起こす。本研究で観察されたクロロフィル含量上位系統で糖含量が高い傾向は、この **Green shoulder** 形質によるクロロフィルの残存と糖の高蓄積に対応する可能性がある。糖増加を引き起こすメカニズムについてさらなる解析を行うためには、本研究にて観察されたクロロフィル含量の系統間差に対する *SIGLK2* の関与の有無を明らかにする必要がある。

2.4.2 高 MHO 系統におけるプロリコペンの蓄積

カロテノイドの定量結果から、MHO の含量が高い “Dixie Golden Giant” に前駆体で

あるリコペンが検出されなかった。代わりに、本系統特異的なカロテノイド由来ピークが検出され、この物質がリコペンに代わり MHO の前駆体として機能している可能性が示唆された。

UV スペクトルからこのピークがプロリコペン由来であると推定されたことに加え、先行研究にて“Dixie Golden Giant”のカロテン異性化酵素 (CRTISO) をコードする遺伝子上に変異が存在することが示されている (Roohanitaziani et al., 2020)。そのため、本系統ではプロリコペンから *all-trans*-リコペンへの異性化がほとんど行われず、代わりにプロリコペンを蓄積すると考えられる。

また、*CRTISO* 遺伝子の変異体である *tangerine* 系統トマトの果実では、MHO とゲラニルアセトンの含量が野生型として用いられた“Ailsa Craig”と比べて 2-10 倍であったことが報告されている (Lewinsohn et al., 2005; Vogel et al., 2010)。これらの研究ではアポカロテノイド香気成分の生合成に関与する他の遺伝子については言及していないものの、*CRTISO* のノックダウンがアポカロテノイド香気成分含量の増加に関連することを示唆している。

トマト果実で発現するカロテノイド開裂酵素の CCD1b はリコペンの末端を酸化開裂し MHO を遊離させる (Vogel et al., 2008)。プロリコペンは 7,9,7',9' -tetra-*cis* 体であり (Isaacson et al., 2004)、切断部位である 5 位から末端にかけては *all-trans* 型と同じ構造を取っている。そのため、プロリコペンも *all-trans*-リコペンと 5 位で切断され、同様に MHO が生成される可能性が考えられる (図 2-9)。また、*all-trans* 型のリコペンは有機溶媒中で容易に結晶化し、トマト果実の有色体中でも結晶として存在する (Coyago-cruz et al., 2019)。一方、*cis* 型のカロテノイドは *trans* 型と比べて結晶性が低い (Alagoz et al., 2018)。このため、*all-trans* 型よりも結晶性の低いプロリコペンは CCD 酵素との接触効率が異なる可能性が考えられ、そのこと

が MHO 放出増大に寄与している可能性がある。

時間 (分)	移動相 B 濃度 (%)
0	1
9	1
9.5	6
19	7
20	18
27	20
28	34
58	36
63.5	100
64	1
70	-

表 2-1 本研究にて使用した HPLC のタイムプログラム

移動相 A(メタノール/水(95:5), 0.1%トリエチルアミン)と移動相 B(ヘキサン/イソプロピルアルコール(60:40, v/v, 0.1%トリエチルアミン)の2種類を用いてグラジエント分析を行った。

表 2-2 トマト 157 系統のカロテノイドおよびクロロフィル含量

Line #	Variety Name	Chl a (mg/g DW)	Chl b (mg/g DW)	Total carotenoids (mg/g DW)	Lycopene (mg/g DW)	% Chl	% Lyc/Car
TS-100	EA03456	0.012	0.016	0.713	0.407	3.43%	57.08%
TS-104	Pomodoro Costoluto Genovese	0.019	0.021	1.182	0.691	3.03%	58.46%
TS-105	EA01448	0.057	0.027	1.150	0.615	6.34%	53.48%
TS-106	Unknown cultivar	0.045	0.032	1.037	0.523	6.39%	50.43%
TS-108	Puno I	0.034	0.017	1.227	0.726	3.70%	59.17%
TS-109	Madara	0.030	0.019	1.011	0.590	4.23%	58.36%
TS-111	Santa Clara Canner	0.019	0.017	1.475	0.911	2.17%	61.76%
TS-112	Solnecnyj	0.012	0.019	1.123	0.622	2.49%	55.39%
TS-114	Ijulskij	0.040	0.028	0.933	0.506	6.29%	54.23%
TS-118	LA0292	0.042	0.022	0.759	0.416	7.28%	54.81%
TS-120	Lee Williams	0.027	0.001	0.374	0.070	6.36%	18.72%
TS-129	Moyobamba	0.031	0.027	1.286	0.735	4.06%	57.15%
TS-131	Cuba Plum	0.020	0.008	1.538	0.889	1.64%	57.80%
TS-134	La Estancilla	0.028	0.008	1.682	1.012	1.93%	60.17%
TS-138	Malintka 101	0.000	0.037	2.029	1.207	1.65%	59.49%
TS-139	Red Setter	0.027	0.016	1.397	0.813	2.77%	58.20%
TS-154	Muna	0.047	0.030	0.934	0.525	7.12%	56.21%
TS-157	Astrachan	0.019	0.019	0.757	0.429	4.36%	56.67%
TS-158	PE-67	0.070	0.043	1.650	0.978	5.95%	59.27%
TS-159	Polijarnyj	0.028	0.031	1.127	0.637	4.61%	56.52%
TS-160	Success	0.021	0.022	1.350	0.814	2.82%	60.30%
TS-165	Veracruz	0.039	0.027	0.077	0.014	44.34%	18.18%
TS-167	Tegucigalpa	0.032	0.033	2.096	1.298	2.78%	61.93%
TS-169	Cuor di bue di Albenga	0.020	0.023	1.652	1.009	2.34%	61.08%
TS-172	Early Dwarf	0.014	0.007	1.362	0.792	1.36%	58.15%
TS-175	Delight	0.039	0.023	1.463	0.851	3.80%	58.17%
TS-176	Unknown cultivar 8	0.046	0.026	0.678	0.363	8.94%	53.54%

TS-177	DANA	0.017	0.012	1.091	0.655	2.44%	60.04%
TS-179	CRIMEAN	0.018	0.010	0.588	0.326	4.16%	55.44%
TS-181	LA1457	0.058	0.044	1.334	0.756	6.58%	56.67%
TS-183	Hellfrucht, Rotfruechtig	0.013	0.012	0.736	0.426	3.08%	57.88%
TS-187	Monplaisir	0.053	0.024	0.978	0.568	6.78%	58.08%
TS-189	Nagcarlang	0.029	0.018	1.074	0.606	3.90%	56.42%
TS-190	Santa Chiara	0.012	0.011	1.253	0.741	1.64%	59.14%
TS-191	Francescano	0.026	0.017	0.756	0.417	4.98%	55.16%
TS-196	Ailsa Craig	0.037	0.022	1.117	0.586	4.66%	52.46%
TS-197	Libanese	0.029	0.028	0.656	0.387	7.43%	58.99%
TS-202	LA2402	0.050	0.042	0.848	0.500	9.05%	58.96%
TS-205	Unknown cultivar 9	0.027	0.025	2.017	1.253	2.32%	62.12%
TS-209	Da serbo	0.063	0.036	0.176	0.053	34.18%	30.11%
TS-212	Flora-Dade	0.011	0.020	0.522	0.298	5.23%	57.09%
TS-213	Unknown cultivar 10	0.024	0.016	0.252	0.096	12.95%	38.10%
TS-215	Vrbikanske Nizke	0.036	0.038	1.206	0.695	5.38%	57.63%
TS-216	Phyra	0.046	0.017	1.254	0.710	4.41%	56.62%
TS-219	Mobalcon	0.026	0.021	1.163	0.670	3.62%	57.61%
TS-221	Jalapa	0.050	0.029	1.683	0.988	4.12%	58.70%
TS-226	Microtom	0.012	0.016	1.216	0.708	2.12%	58.22%
TS-227	Atom	0.026	0.024	1.450	0.866	3.09%	59.72%
TS-229	LA1620	0.030	0.010	0.986	0.577	3.57%	58.52%
TS-232	Tigerly	0.055	0.043	1.382	0.784	6.18%	56.73%
TS-234	Red Streak	0.027	0.026	0.364	0.208	11.88%	57.14%
TS-235	Belmonte	0.032	0.028	1.093	0.631	4.86%	57.73%
TS-236	Zerevo 109'	0.022	0.011	1.283	0.771	2.35%	60.09%
TS-238	Macas	0.027	0.025	0.981	0.561	4.73%	57.19%
TS-243	Unknown cultivar 11	0.044	0.025	1.253	0.739	4.83%	58.98%
TS-245	NK VI	0.017	0.016	1.397	0.854	2.12%	61.13%
TS-247	N 795 Pescio	0.014	0.024	1.688	1.000	2.06%	59.24%
TS-248	Unknown cultivar 12	0.040	0.034	1.294	0.779	5.00%	60.20%

TS-249	Merida	0.017	0.006	0.580	0.336	3.48%	57.93%
TS-25	Clémentine	0.031	0.010	0.069	0.013	35.27%	18.84%
TS-250	Yellow cherry	0.026	0.009	0.392	0.192	7.58%	48.98%
TS-251	Unknown cultivar 13	0.027	0.026	0.578	0.324	7.80%	56.06%
TS-252	Unknown cultivar 14	0.012	0.008	1.482	0.865	1.24%	58.37%
TS-255	ostankinskij 121	0.014	0.019	1.865	1.090	1.58%	58.45%
TS-257	Marpha N2	0.034	0.022	1.736	1.013	2.86%	58.35%
TS-258	Minibel	0.045	0.030	0.842	0.368	7.58%	43.71%
TS-26	Unknown cultivar 1	0.061	0.035	1.075	0.609	7.61%	56.65%
TS-261	LA1511	0.021	0.023	1.292	0.760	3.07%	58.82%
TS-263	Rio Grande	0.022	0.014	1.273	0.774	2.52%	60.80%
TS-27	N135 Green Gage	0.050	0.018	0.056	0.014	52.97%	25.00%
TS-271	Linosa	0.024	0.015	0.503	0.227	6.65%	45.13%
TS-273	PE-63	0.025	0.017	0.971	0.551	3.88%	56.75%
TS-276	Stage	0.021	0.020	1.427	0.838	2.59%	58.72%
TS-278	Early Santa Clara	0.019	0.023	1.798	1.051	2.09%	58.45%
TS-28	N 347 Yablochnyi	0.012	0.024	0.759	0.440	4.11%	57.97%
TS-280	Cerise du sud ouest N 2	0.036	0.018	1.485	0.886	3.24%	59.66%
TS-281	San Martin de Pangoa	0.042	0.030	1.018	0.542	6.14%	53.24%
TS-283	Cisterno	0.036	0.025	0.914	0.516	5.83%	56.46%
TS-285	Kopiah	0.012	0.010	1.300	0.785	1.56%	60.38%
TS-286	Allungato piccolo	0.015	0.009	1.702	1.025	1.30%	60.22%
TS-288	Unknown cultivar 15	0.016	0.017	2.068	1.264	1.47%	61.12%
TS-29	Unknown cultivar 2	0.019	0.011	0.839	0.456	3.12%	54.35%
TS-290	N 2257 Dikorastushii..	0.024	0.027	1.051	0.590	4.28%	56.14%
TS-293	Green Zebra	0.204	0.104	0.100	0.020	74.10%	20.00%
TS-294	N 933	0.034	0.013	1.151	0.655	3.62%	56.91%
TS-296	Droplet	0.013	0.019	1.168	0.680	2.46%	58.22%

TS-297	Iezaoshang	0.016	0.021	1.580	0.933	2.10%	59.05%
TS-298	San Francisco	0.034	0.034	1.639	0.977	3.70%	59.61%
TS-299	Bomboiza	0.040	0.034	1.232	0.718	5.23%	58.28%
TS-300	Tena	0.027	0.027	1.174	0.674	4.03%	57.41%
TS-301	Santa Cruz near Shintuyo	0.059	0.050	1.419	0.824	6.63%	58.07%
TS-302	Upper Parana	0.021	0.018	1.276	0.724	2.80%	56.74%
TS-303	Los Banos	0.099	0.046	1.384	0.750	8.82%	54.19%
TS-304	Tarapoto	0.014	0.016	1.750	1.040	1.60%	59.43%
TS-31	LA1464	0.033	0.032	1.692	0.983	3.45%	58.10%
TS-34	LA2675	0.029	0.020	1.456	0.843	3.02%	57.90%
TS-35	Richters	0.048	0.042	1.475	0.847	5.37%	57.42%
TS-36	PI187002-1	0.045	0.027	0.844	0.452	7.28%	53.55%
TS-401	Unknown cultivar 16	0.017	0.010	1.639	0.998	1.50%	60.89%
TS-42	Skorospelka 01165	0.010	0.007	1.204	0.728	1.27%	60.47%
TS-450	my	0.030	0.018	0.417	0.220	9.65%	52.76%
TS-47	Sibirsky Skorospelyj	0.021	0.010	1.693	1.022	1.66%	60.37%
TS-506	Chadwick Cherry	0.016	0.012	1.223	0.727	2.05%	59.44%
TS-508	Cherry Roma	0.079	0.049	0.920	0.480	11.41%	52.17%
TS-509	Clear Pink Slicer	0.014	0.005	0.431	0.242	3.89%	56.15%
TS-51	Unknown cultivar 3	0.025	0.019	1.008	0.601	3.82%	59.62%
TS-513	Dixie Golden Giant	0.017	0.005	0.213	0.043	8.61%	20.19%
TS-517	German Queen	0.023	0.029	0.941	0.563	4.86%	59.83%
TS-518	Giant Belgium	0.016	0.001	1.335	0.794	1.14%	59.48%
TS-522	Gulf State Market	0.006	0.020	1.353	0.802	1.76%	59.28%
TS-523	Hillbilly	0.024	0.025	0.342	0.180	11.72%	52.63%
TS-526	Large Red Cherry	0.036	0.026	1.202	0.666	4.59%	55.41%
TS-527	Legend	0.012	0.027	1.091	0.676	3.16%	61.96%
TS-528	Lemon Drop	0.060	0.036	0.046	0.010	65.76%	21.74%
TS-53	LA2095	0.030	0.031	1.877	1.138	2.92%	60.63%
TS-532	Maglia Rosa Cherry	0.017	0.018	1.165	0.705	2.72%	60.52%

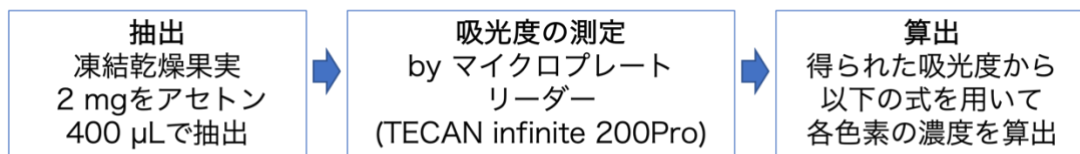
TS-533	Marmande VFA	0.012	0.027	0.656	0.374	5.15%	57.01%
TS-537	Mexico Midget	0.029	0.018	0.935	0.545	4.42%	58.29%
TS-54	cerise rose	0.027	0.019	2.142	1.277	1.94%	59.62%
TS-544	Oregon Spring Bush	0.022	0.032	1.140	0.686	4.16%	60.18%
TS-55	PONDEROSA	0.015	0.016	2.051	1.248	1.35%	60.85%
TS-554	Santiam	0.011	0.020	1.216	0.716	2.29%	58.88%
TS-556	St. Pierre	0.013	0.025	0.806	0.474	4.16%	58.81%
TS-56	LA1320	0.007	0.016	0.776	0.394	2.58%	50.77%
TS-57	LA1307	0.032	0.022	1.327	0.730	3.61%	55.01%
TS-574	Arkansas Traveler	0.014	0.021	0.953	0.559	3.28%	58.66%
TS-583	Burbank	0.013	0.005	0.603	0.344	2.72%	57.05%
TS-585	Chocolate Cherry	0.158	0.078	0.981	0.567	18.19%	57.80%
TS-586	Christmas Grapes	0.053	0.036	0.847	0.489	8.82%	57.73%
TS-59	Perlat	0.021	0.023	1.200	0.707	3.27%	58.92%
TS-600	Kellogg's Breakfast	0.048	0.021	0.254	0.064	20.12%	25.20%
TS-601	LA1673	0.010	0.015	0.696	0.424	3.12%	60.92%
TS-61	Huayvaruni	0.022	0.013	1.416	0.859	2.24%	60.66%
TS-610	Pink Ping Pong	0.023	0.018	0.632	0.341	5.74%	53.96%
TS-614	Red Currant	0.046	0.035	0.586	0.336	11.34%	57.34%
TS-615	Red Fig Tomato	0.025	0.041	1.382	0.818	4.25%	59.19%
TS-618	Riesentraube	0.023	0.009	0.946	0.542	3.05%	57.29%
TS-62	Unknown cultivar 4	0.027	0.012	1.633	0.992	2.17%	60.75%
TS-623	Sugar Lump	0.051	0.013	0.761	0.420	7.14%	55.19%
TS-63	Unknown cultivar 5	0.017	0.016	0.044	0.007	40.89%	15.91%
TS-630	Florida47	0.024	0.020	0.656	0.387	5.82%	58.99%
TS-631	Celebrity VFFNTA Hybrid	0.035	0.018	0.917	0.526	5.03%	57.36%
TS-632	Mountain Spring VFF Hybrid	0.016	0.015	0.759	0.438	3.55%	57.71%

TS-633	Bush Early Girl VFFNT Hybrid	0.024	0.015	1.403	0.839	2.48%	59.80%
TS-634	BHN 589 VFFT Hybrid	0.016	0.016	0.953	0.562	2.99%	58.97%
TS-635	Tasti-Lee VFFF Hybrid	0.014	0.016	1.128	0.686	2.38%	60.82%
TS-637	Better Bush VFN Hybrid	0.015	0.013	1.269	0.754	2.01%	59.42%
TS-638	Solar Fire VFFF Hybrid	0.021	0.021	0.949	0.566	3.97%	59.64%
TS-640	FL8059	0.023	0.014	0.990	0.587	3.38%	59.29%
TS-65	LA1482	0.036	0.028	1.298	0.702	4.33%	54.08%
TS-650	Bear_Creek	0.093	0.052	1.657	0.988	7.53%	59.63%
TS-75	Poire jaune	0.025	0.028	0.037	0.009	57.12%	24.32%
TS-76	Ferry Morse Beesteak	0.016	0.018	0.762	0.431	4.00%	56.56%
TS-83	Unknown cultivar 6	0.021	0.018	1.374	0.798	2.58%	58.08%
TS-88	Unknown cultivar 7	0.012	0.004	1.372	0.758	1.05%	55.25%
TS-90	Nevskij	0.017	0.012	1.616	0.968	1.68%	59.90%
TS-91	N 2759 Enano	0.016	0.014	0.928	0.540	2.89%	58.19%

biological replicate: $n = 2-3$, analytical replicate: $N = 1-2$

DW, dry weight: % Chl、測定した色素の総量 (クロロフィル a 含量, クロロフィル b 含量, カロテノイド総量の和) に対するクロロフィルの割合:

% Lyc/Car、カロテノイド総量に対するリコペンの割合



$$\text{Chl a (mg/g DW): } c_a = (12.25A_{663} - 2.79A_{647}) \times \frac{v}{w}$$

$$\text{Chl b (mg/g DW): } c_b = (21.50 A_{647} - 5.10 A_{663}) \times \frac{v}{w}$$

$$\text{Carotenoids (Total) (mg/g DW) = } \frac{(1000A_{470} - 1.82c_a - 85.02c_b)}{198} \times \frac{v}{w}$$

$$\text{Lycopene (mg/g DW) = } \frac{A_{506}}{315} \times \frac{v}{w}$$

図 2-1 本研究にて確立したマイクロプレートリーダーによるクロロフィル・カロテノイド簡便分析法のワークフロー

A_x : x nm における吸光度 v : 溶媒の体積 (mL) w : サンプル重量 (mg)

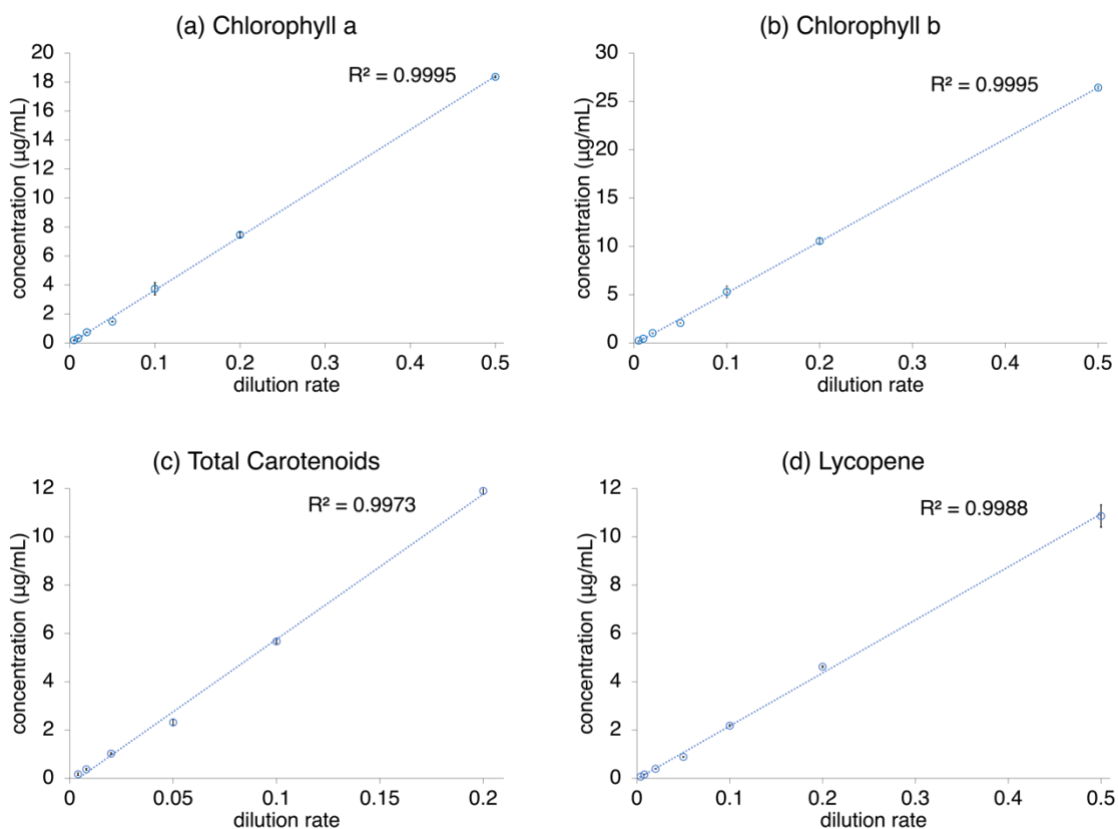


図 2-2 クロロフィル・カロテノイド標準品による検出下限の確認

(a) クロロフィル a; (b) クロロフィル b; (c) カロテノイド総量; (d) リコペン
 横軸の希釈率 (Dilution rate) は、本測定に供した化合物の最大濃度を 1 としたときの相対濃度を示す。図中のエラーバーは標準偏差 (Analytical replicate; $N = 3$) を、 R^2 は相関係数を示す。

(c) で示す HPLC-PDA でのカロテノイド総量は、リコペン、 β -カロテン、ルテインの定量値の合計である。

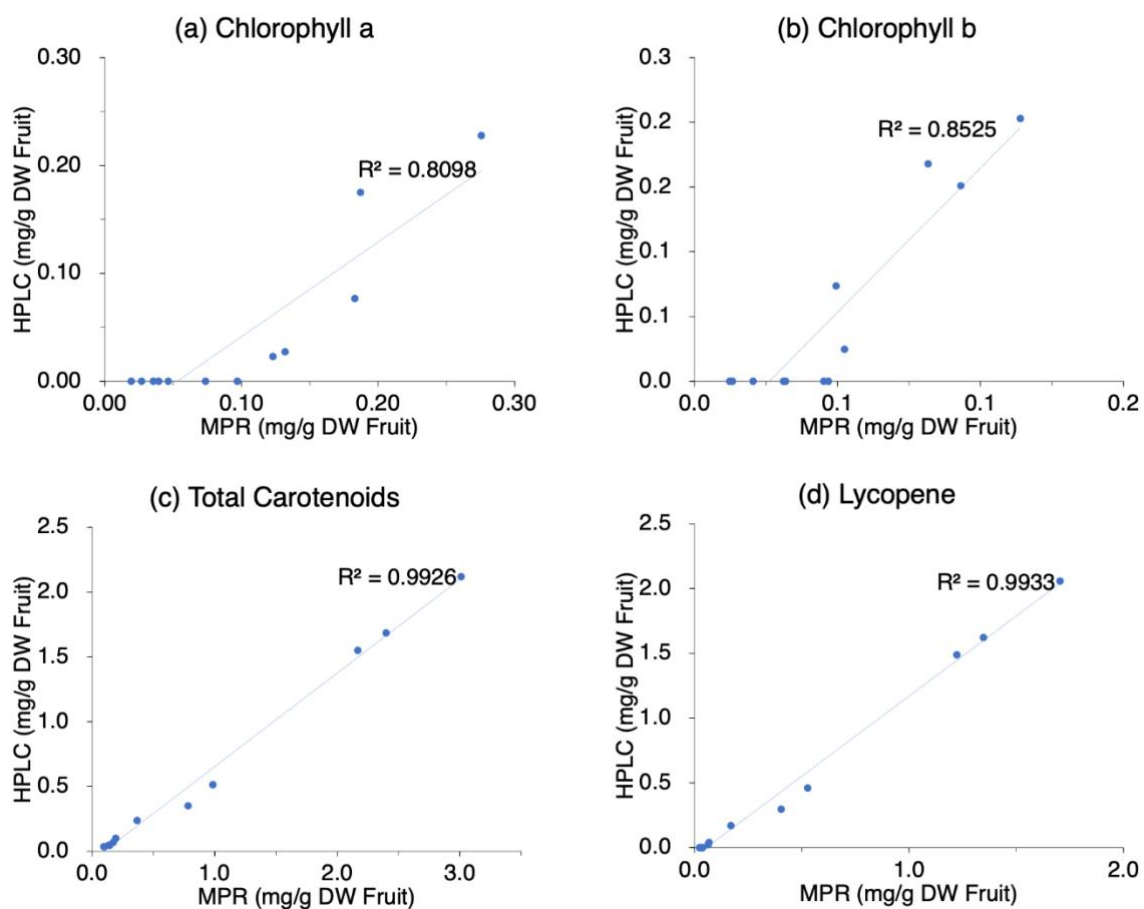


図 2-3 マイクロプレートリーダー (MPR) と HPLC-PDA (HPLC) による各色素定量値の散布図および測定法間の相関係数

(a) クロロフィル a; (b) クロロフィル b; (c) カロテノイド総量; (d) リコペン

(c) で示す HPLC-PDA でのカロテノイド総量は、リコペン、 β -カロテン、ルテインの定量値の合計である。

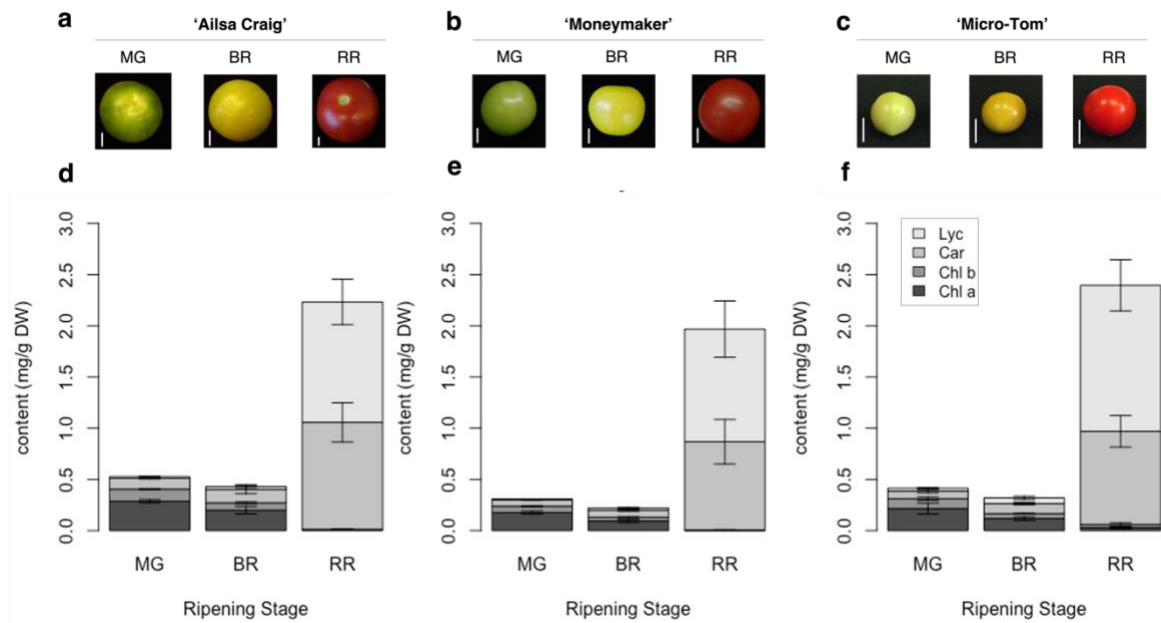


図 2-4 代表的なトマト系統のカロテノイド・クロロフィル含量

(a)-(c): 果実の外観; (d)-(f): 各成熟段階における果実色素含量は生物学的反復 ($n = 3$) の平均値を、エラーバーは標準偏差を示す。カロテノイド含量 (Car, mg/g DW) はカロテノイド総量 (mg/g DW) からリコペン含量 (Lyc, mg/g DW) を減算して算出した。

MG: 緑熟期、 BR: 催色期、 RR: 赤熟期

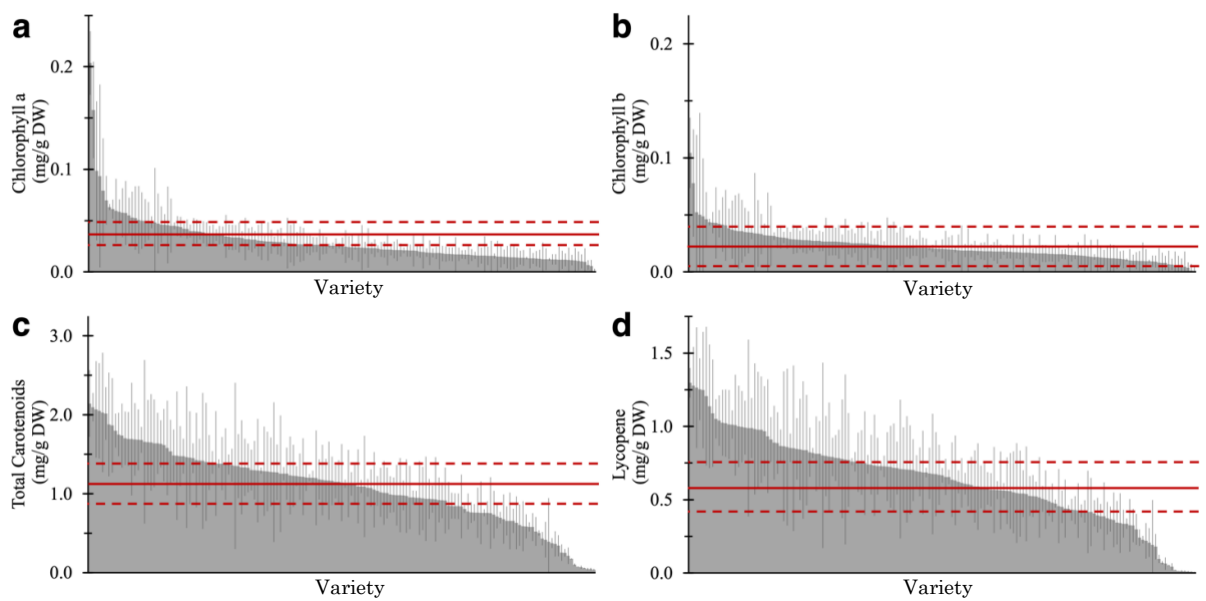


図 2-5 トマト 157 系統のカロテノイド・クロロフィル含量

(a) クロロフィル a; (b) クロロフィル b; (c) カロテノイド総量; (d) リコペン
 “Ailsa Craig” の含量平均を赤の実線、標準偏差を赤の点線で示す。エラーバーは標準偏差を示す。

biological replicate: $n = 2-3$, analytical replicate: $N = 1-2$

biological replicate = 2 の場合は analytical replicate = 2、biological replicate = 3 の場合は analytical replicate = 1 とした。

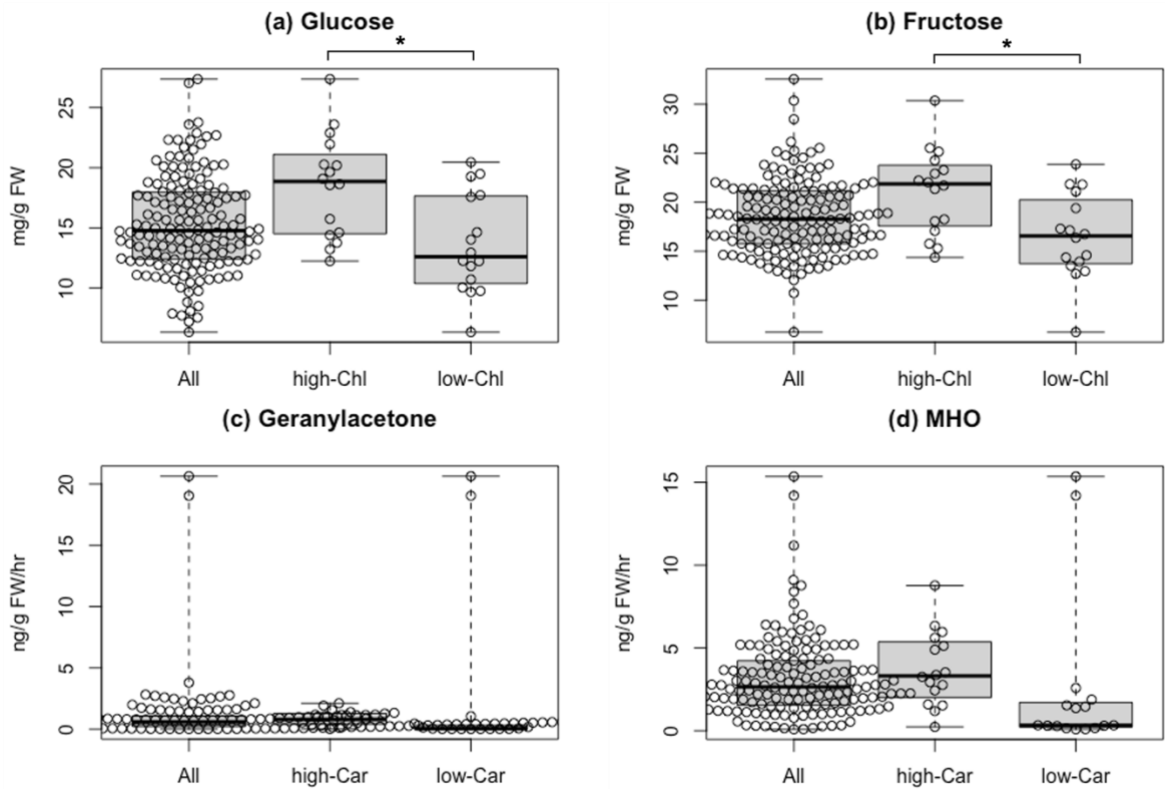


図 2-6

- (a) クロロフィル含量上位および下位 10%系統におけるグルコース含量
 (b) クロロフィル含量上位および下位 10%系統におけるフルクトース含量

各ボックスプロットで、ボックスの下限と上限はそれぞれ第 1 および第 3 四分位数を示し、中央の線は中央値を示す。ひげは下位または上位四分位数の 1.5 倍の四分位範囲を表す。蜂群図は各系統の個別の含量を示す。

*: Welch' s t-test $p < 0.05$

- (c) カロテノイド総量上位および下位 10%系統(16 系統)におけるゲラニルアセトン含量
 (d) カロテノイド総量上位および下位 10%系統(16 系統)における MHO 含量

各ボックスプロットで、ボックスの下限と上限はそれぞれ第 1 および第 3 四分位数を示し、中央の線は中央値を示す。ひげは下位または上位四分位数の 1.5 倍の四分位範囲を表す。蜂群図は各系統の個別の含量を示す。

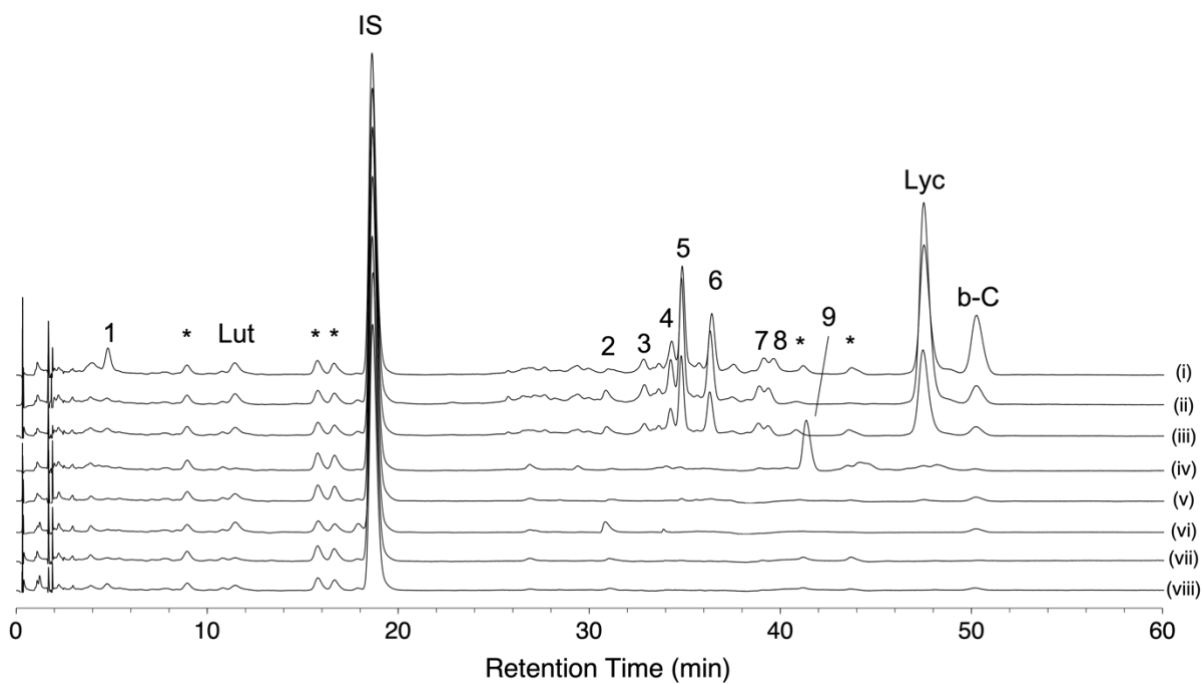


図 2-7 HPLC-PDA 分析によるトマト 8 系統のクロマトグラム

(i) “Ailsa Craig” ; (ii) “Bear Creek” ; (iii) “Chocolate Cherry” ;
 (iv) “Dixie Golden Giant” ; (v) “Green Gage” ; (vi) “Green Zebra” ; (vii)
 “Lemon Drop” ; (viii) “Poire Jaune”

IS: 内部標準 ($trans$ - β -アポ-8'-カロテナール) , Lut: ルテイン、Lyc: リコペン、b-C: β -カロテン

1-9: カロテノイド様ピーク

*: 非カロテノイドピーク

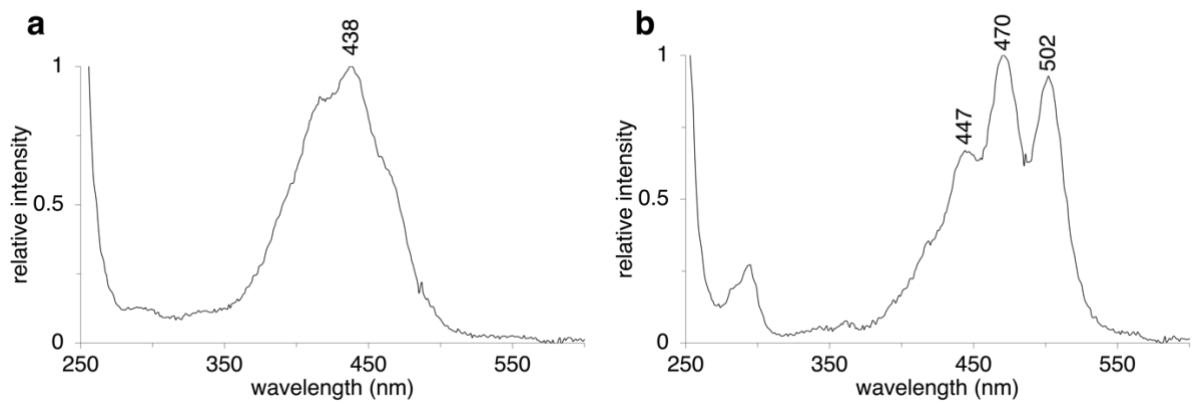


図 2-8 HPLC-PDA 分析で得られた UV スペクトル

(a) ピーク番号 9 (b) 本研究にて標準品の測定により得られた *all-trans*-リコペンのスペクトル

図中の数字は UV スペクトルのピークにおける吸収波長 (nm) を示す。

第3章 ゲノムワイド関連解析による色素含量関連遺伝子の探索

3.1 緒言

本研究では、果実サイズと負の相関があるとされている糖分含量に代わり、トマト果実の甘味を増大させる化合物としてアポカロテノイド香気成分に着目した。第1章で述べた通り、先行研究にてアポカロテノイドの生合成メカニズムや含量制御に関わる遺伝子の探索が行われているが、含量上昇に繋がるメカニズムは十分に解明されていない。一方、他の香気成分の含量制御の例として、脂肪酸由来香気成分の放出量が、前駆体であるリノール酸やリノレン酸を細胞膜から遊離させる酵素をコードする *SL-LIP8* の高発現によって増加する例が報告されている (Li et al., 2020)。そのため、前駆体であるカロテノイド含量に影響する遺伝子座を特定することはアポカロテノイド香気成分の含量増大に繋がる可能性がある。第2章では、アポカロテノイド香気成分である MH0 を高生産する系統である “Dixie Golden Giant” のカロテノイド組成を分析し、本系統に特異的に蓄積するプロリコペンがその高生産の鍵になる可能性が示唆された。しかし、前駆体であるカロテノイドの量的な変化がアポカロテノイド香気成分の生産に与える影響は明らかにできなかった。

そこで本研究は、カロテノイドの含量制御を通じてフレーバー化合物の含量に影響しうる遺伝子座の特定を目的とし、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を実施した。その結果、カロテノイド含量に有意に関連するマーカーを複数検出した。続いて、検出したマーカー近傍の遺伝子から候補を絞り込むために、マーカー近傍遺伝子の果実中での発現を解析し、マーカー間で有意に発現が異なる遺伝子を得た。これらの結果を元に、色素含量に影響を与えうる遺伝子の候補を選抜した。

3.2 材料および方法

3.2.1 ゲノムワイド関連解析

本研究にて得たカロテノイド総量およびリコペンの定量値を用いて、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。先行研究 (Tiemann et al., 2017; Razifard et al., 2020) および共同研究者によってゲノム配列が取得されたトマト系統のうち、本研究にて定量値を測定した 338 系統を解析に供した。リファレンスゲノムとして、エクアドル由来の *S. pimpinellifolium* 系統である “BGV006775” (Alonge et al., 2019) を使用した。解析ソフトウェアとして GEMMA (Zhou and Stephens, 2012) を使い、解析モデルは Bayesian sparse linear mixed model (BSLMM) (Zhou et al., 2013) を採用した。

3.2.2 GWAS 候補領域中遺伝子のマーカー間における示差的発現解析

先行研究 (Zhu et al., 2018) においてトマト果実のターニング期 (Turning, 催色期から 3 日後) の RNA-seq データが取得されている。そのうち、本研究で SNP マーカーの情報を得た 316 系統について解析を行った。リードカウントは fragments per kilobase of transcript per million reads mapped (FPKM) 法によって正規化した。最低 1 サンプルで FPKM が 0 以上である遺伝子を果実中で発現がある遺伝子と定義し、マーカー間の発現比較に供した。 p 値の計算およびボックスプロットの描画は統計ソフト R (バージョン 3.6.3)、RStudio (Build 492) および R パッケージ “limma” を用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 GWAS によるトマト染色体上のカロテノイド関連領域の検出

GWAS の結果に基づき描画したマンハッタンプロットを図 3-1 に示す。

有意に検出された (posterior inclusion probability > 0.1) SNP マーカーの個数は、カロテノイド総量について 9、リコペンについて 11 であった。先行研究 (Li et al., 2020) にてトマトにおける平均連鎖不平衡距離を 0.5 Mb とし、GWAS で検出されたマーカー近傍領域から候補遺伝子の探索を行った例がある。本研究はこれに従い、マーカー上流および下流 0.5 Mb から候補遺伝子を探索することとした。

カロテノイド総量とリコペンの GWAS 双方にて、第 3 染色体 (BGV1.3ch03_4200661, 図 3-1 (i)) が共通して検出された。第 3 染色体上のマーカー (i) 上流・下流それぞれ 500 kb の領域に存在する遺伝子を図 3-2a, 表 3-1a に示す。検出された候補マーカーから約 20 kb 上流に、カロテノイド生合成経路の出発物質であるフィトエンを合成する酵素をコードする *Phytoene synthase 1* (Solyc03g031860) が存在した。本遺伝子の変異が、リコペンを欠く黄色の果実を示す “Yellow flesh” と呼ばれる表現型の原因であることが先行研究で明らかになっており (Fray and Grierson, 1993)、本遺伝子が今回検出された第 3 染色体マーカー近傍のカロテノイド関連遺伝子である可能性が高いと考えられた。

一般にトマト果実のカロテノイドは催色期以降のリコペンの爆発的な生合成に従って増加するため、成熟果実に蓄積するカロテノイドの大半をリコペンが占める。また、マーカー (i) として検出された候補遺伝子でカロテノイド合成の鍵遺伝子である *PSY1* は、カロテノイド総量とリコペンの GWAS 双方で検出された。よって、上記の例と同様にカロテノイド総量とリコペンの双方にて検出されるマーカーが有力な候補になると考え、以降の解析を進めた。

マーカー (i) の他に、第 9 染色体上のマーカー (BGV1.3ch09_54463263, 図 3-1 (vii)) がカロテノイド総量およびリコペンの GWAS 双方で検出された。マーカーの上流・下流それぞれ 500 kb 領域上の遺伝子を図 3-2 および表 3-1c に示す。この領域には 19 の遺伝子が存在していたが、カロテノイド生合成を触媒する酵素遺伝子 (*PDS*, *ZISO*, *CrtISO* など) や分解を触媒する酵素 (*CCD* など) の存在は検出できなかった。

第 5 染色体上では約 9 kb の連続した SNP マーカーが検出された (図 3-1 (ii)-(vi))。マーカーから染色体末端までの約 200kb および下流 500 kb の領域に存在する遺伝子を図 3-2b および表 3-1b に示す。この領域には 86 の遺伝子が存在していたが、第 9 染色体のマーカー (vii) 近傍と同様にカロテノイド生合成・分解を触媒する酵素遺伝子は存在しなかった。

3.3.2 候補遺伝子群のマーカー間における発現の解析

候補マーカーの近傍領域からカロテノイド含量に影響する遺伝子を絞り込むために、先行研究 (Zhu et al., 2018) で取得されたターニング期 (Turning, 催色期から 3 日後) のトマト果実における RNA-seq データから候補領域の遺伝子発現を抽出し、異なるマーカーを持つ系統間における発現量を比較した。なお、第 9 染色体上の候補マーカー (vii) については対立 (A; Alternative) マーカーを持つ系統の RNA-seq データが十分量得られなかった ($n = 2$) ため解析から除外した。

第 3 染色体上の候補マーカー (i) 近傍遺伝子について、*PSY1* 以外に候補が存在するかを確認するため遺伝子発現解析を行った。候補遺伝子のうち、両マーカー系統で発現が認められた 63 遺伝子について、対立マーカーを持つ系統 (A, $n = 17$) とリファレンスマーカーを持つ系統 (R; Reference, $n = 258$) との間での発現量を比較した。マーカー間での発現に有意差が見られた遺伝子を表 3-2 に示す。先述した本領域の候

補遺伝子である *PSYI* (Solyc03g031860) に関して、発現にマーカー間の有意差が見られた ($p = 0.04$)。この他に、*PSYI* から約 3.5 kb 下流に存在する Solyc03g031870 (CoA ligase, $p = 5.74 \times 10^{-42}$) を含む 6 の遺伝子についてマーカー間にて発現の有意差が見られた。

第 5 染色体上のマーカー (ii) - (iv) が存在する領域については中間に位置する (iii) のマーカー間の示差発現を解析した。本マーカーについては、A マーカーを持つ系統において R マーカーを持つ系統よりもカロテノイド総量とリコペン含量が有意に高かった (カロテノイド総量: A ($n = 31$): 1.77 mg/g DW, R ($n = 308$): 1.32 mg/g DW, $p = 6/85 \times 10^{-5}$; リコペン含量: A ($n = 31$): 0.99 mg/g DW, R ($n = 308$): 0.70 mg/g DW, $p = 1.43 \times 10^{-5}$)。

対立マーカーを持つ系統 (A, $n = 10$) とリファレンスマーカーを持つ系統 (R, $n = 286$) との間で、マーカー近傍に存在し両マーカー系統にて発現がある 54 の候補遺伝子の発現量を比較した。マーカー間での発現に有意差が見られた遺伝子を表 3-3 に示す。

マーカー間で有意に発現が異なる 18 遺伝子のうち、Solyc05g005140 (Protein NSP-INTERACTING KINASE 3), Solyc05g005300 (bHLH transcription factor 084), Solyc05g005150 (F-box/Kelch repeat-containing F-box family protein), Solyc05g005240 (YABBY) は両グループで低い発現 (FPKM < 1) を示した。最も高い発現量 (FPKM) を示したのは Solyc05g005490 (carbonic anhydrase、A で平均 331.03、R で平均 457.00)、最もマーカー間の平均発現量の比が大きかったのは Solyc05g005170 (Pectin lyase-like superfamily protein) であり A で平均 2.06、R で平均 0.08、A/R = 25.8 であった。

3.4 考察

3.4.1 *PSY1* および隣接する遺伝子の発現

本研究で示された *PSY1* のマーカー間示差発現は、先行研究 (Domínguez et al., 2020) で言及されている、*PSY1* の最終エクソンに欠失を持つアレルである I^{DEL} によるものである可能性が高いと考えられる。

I^{DEL} アレルを持つ系統の大半は黄色の成熟果実を持ち、また I^{DEL} を持つ系統では *PSY1* の発現が野生型アレルを持つ系統よりも有意に低いことが示されている。さらに、この I^{DEL} アレルに存在する *PSY1* 最終エクソンからの欠失が隣接した遺伝子である Solyc03g031870 (AMP-dependent synthetase/ligase) まで約 6 kb に及ぶことが明らかになっている。この欠失が Solyc03g031870 (AMP-dependent synthetase/ligase) の発現に及ぼす効果は不明であるものの、本研究にて確認された有意な発現量の差はこの塩基欠失に関連して引き起こされる可能性が考えられる。

3.4.2 第 5 染色体上から選抜した候補遺伝子

マーカー (iii) 近傍においてマーカー間で有意に異なる発現が確認された遺伝子のうち、Solyc05g005160 (ATP-citrate synthase) の発現量を図 3-3 に示す。この遺伝子はマーカーから約 24 kb 下流と、十分に発現している (FPKM > 1) 遺伝子の中では最もマーカーに近く、また果実中では成熟過程を通じて果実全体に高く発現している (図 3-4)。この遺伝子は ATP-クエン酸リアーゼ (ACL) の alpha-subunit をコードし、本遺伝子のパラログとして Solyc04g039670 と Solyc01g101040 の 2 つが同定されている (Zhao et al., 2020)、ACLA タンパク質は ACLB とヘテロ八量体を形成して ATP-クエン酸リアーゼとして機能する (Fatland et al., 2002)。ACLA パラログの中でも本遺伝子は、先行研究にて行われた栽培・野生種集団の RNA-seq 解析の結果から、栽培化が進むに従って発現が低下したと推測されている (Liu et al., 2020)。

ACL はミトコンドリアから細胞質に輸出されるクエン酸を補酵素 A と反応させ、アセチル-CoA とオキサロ酢酸を生成する。シロイヌナズナにて本遺伝子のオルソログである *ACLA-1* (At1g10670) のアンチセンス RNA を導入したところ、ACL の発現レベルの低下に応じて植物体の矮小化から致死に至るまでの表現型を示した。そのため、ACL は植物体の正常な発達に必須であると考えられた (Fatland et al., 2005)。

また、本遺伝子は野生種トマトのトライコームが持つ高いセスキテルペン生産を支える一端を担うことが示唆されている。先行研究 (Balcke et al., 2017) にてマルチオミクス解析による野生種 *S. habrochaites* と栽培種 *S. lycopersicum* のトライコーム内代謝の比較が行われ、*ACLA1* が *S. habrochaites* のトライコームにて高発現していることが明らかになった。また、ACL が関与する反応であるクエン酸-リンゴ酸シャトルが、細胞質で合成されるイソプレノイドの前駆体としてアセチル CoA を供給することが示唆された。さらに *S. habrochaites* のトライコームで見られた色素体内セスキテルペンの合成活性化の経路として、細胞質からリンゴ酸などが流入し、非メバロン酸経路を通じてセスキテルペン前駆体として供給される可能性を指摘している。

リコペンを含むカロテノイドも、色素体内のセスキテルペンと同様に非メバロン酸経路に由来する (Ilahy et al., 2019)。ACL の反応生成物であるオキサロ酢酸は、細胞質中でリンゴ酸に変換され、上記のメカニズムと同様に非メバロン酸経路に供給されうる。以上のことから、*ACLA1* の高発現は、細胞質のオキサロ酢酸合成の活性化を通じて色素体内の非メバロン酸経路活性化に間接的に関与し、カロテノイド生合成の増加を引き起こす可能性が考えられる (図 3-5)。今後の展望として、本遺伝子の過剰発現体を用いた機能解析や、遺伝子近傍のゲノム領域のシス因子の探索などを行うことで、本遺伝子がカロテノイド含量の増減に実際に寄与するのか、マーカーと連鎖し本遺伝子の発現量が異なる構造多型が存在するかを明らかにすることができると考えら

れる。

表 3-1 候補マーカー近傍領域に存在する遺伝子のリスト

(a) マーカー BGV1.3ch03_4200661 近傍候補領域 (BGV1.3ch03: 3,700,661-4,700,661) 上の遺伝子

N/A: *Solanum lycopersicum* リファレンスゲノム SL4.0 上に該当遺伝子なし

Distance from the marker (Kb)	Start position	End position	Gene ID (BGV1.3)	Gene ID (SL4.0)	Annotation (ITAG4.0)
-496.68	3701254	3703981	BGV006775_03g026330.3	Solyc03g026330	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit
-497.041	3701776	3703620	BGV006775_03g026320.3	Solyc03g026320	Unknown protein
-491.452	3708537	3709209	BGV006775_03g026340.3	Solyc03g026340	Calcium-dependent protein kinase 4
-488.441	3710175	3712220	BGV006775_03g026345.1	N/A	N/A
-473.383	3719111	3727278	BGV006775_03g026350.3	Solyc03g026350	Zinc finger transcription factor 24
-468.982	3731323	3731679	BGV006775_03g026360.1	Solyc03g026360	Peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
-462.898	3737428	3737763	BGV006775_03g026370.1	Solyc03g026370	Peptidoglycan-binding LysM domain-containing protein
-421.994	3778383	3778667	BGV006775_03g026373.1	Solyc03g026373	Cytochrome P450
-421.206	3778757	3779455	BGV006775_03g026377.1	N/A	N/A
-415.69	3782558	3784971	BGV006775_03g026400.2	Solyc03g026400	F-box/LRR-repeat protein
-410.064	3789070	3790597	BGV006775_03g026415.1	N/A	N/A
-388.492	3798723	3812169	BGV006775_08g006256.1-c8	N/A	N/A
-380.467	3819285	3820194	BGV006775_08g006258.1	N/A	N/A
-378.435	3822068	3822226	BGV006775_03g031410.1	Solyc03g031410	Unknown protein
-366.821	3832065	3833840	BGV006775_03g031420.1	Solyc03g031420	molybdenum cofactor sulfurase
-361.297	3838636	3839364	BGV006775_03g031430.1	Solyc03g031430	urease accessory protein F
-359.839	3839515	3840822	BGV006775_03g031440.3	Solyc03g031440	NAD(P)H dehydrogenase (Quinone)
-340.577	3855448	3860084	BGV006775_03g031470.3	Solyc03g031470	Dihydroflavonol 4-reductase
-336.748	3863334	3863913	BGV006775_03g031480.3	Solyc03g031480	Unknown protein
-332.273	3867244	3868388	BGV006775_03g031490.3	N/A	N/A
-323.278	3877213	3877383	BGV006775_03g031500.1	Solyc03g031500	Unknown protein
-319.346	3880672	3881315	BGV006775_03g031510.3	Solyc03g031510	Fruit-specific protein
-316.556	3883208	3884105	BGV006775_03g031520.3	Solyc03g031520	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
-310.976	3884961	3889685	BGV006775_03g031530.3	Solyc03g031530	Sulfite exporter TauE/SafE family protein 2
-307.187	3893077	3893474	BGV006775_03g031535.1	N/A	N/A

-300.02	3900189	3900641	BGV006775_03g031550.1	Solyc03g031550	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 25
-294.328	3906238	3906333	BGV006775_04g051630.1	N/A	N/A
-283.293	3911000	3917368	BGV006775_03g031560.3	Solyc03g031560	UDP-3-O-acylglucosamine N-acyltransferase
-279.684	3918559	3920977	BGV006775_03g031570.3	Solyc03g031570	Cytochrome b561 and DOMON domain-containing protein
-277.301	3923091	3923360	BGV006775_03g031580.2	Solyc03g031580	Stigma-specific Stigl family protein
-273.641	3924537	3927020	BGV006775_03g031590.3	Solyc03g031590	S-type anion channel SLAH1
-257.005	3937991	3943656	BGV006775_03g031600.3	Solyc03g031600	Peroxisomal membrane protein PMP22
-253.632	3946766	3947029	BGV006775_03g031610.1	Solyc03g031610	Unknown protein
-250.041	3947360	3950620	BGV006775_03g031620.3	Solyc03g031620	5'-adenylylsulfate reductase 1, chloroplastic
-246.131	3953651	3954530	BGV006775_03g031630.3	Solyc03g031630	Calcium-binding EF-hand family protein-like
-242.679	3955046	3957982	BGV006775_03g031650.3	Solyc03g031650	Autophagy-related protein
-235.047	3960840	3965614	BGV006775_03g031655.1	N/A	N/A
-235.059	3960911	3965602	BGV006775_03g031660.1	Solyc03g031660	Unknown protein
-224.224	3968293	3976437	BGV006775_03g031670.3	Solyc03g031670	calcium-dependent protein kinase
-202.497	3985854	3998164	BGV006775_03g031680.3	Solyc03g031680	hypothetical protein
-195.249	4001302	4005412	BGV006775_03g031690.3	Solyc03g031690	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit rpabc3
-192.753	4007549	4007908	BGV006775_02g080450.1-c4	N/A	N/A
-180.131	4017432	4020530	BGV006775_03g031700.3	Solyc03g031700	Fe-S cluster assembly protein SufB
-176.752	4022683	4023909	BGV006775_03g031710.2	Solyc03g031710	AT hook motif-containing protein
-169.256	4024861	4031405	BGV006775_03g031720.3	Solyc03g031720	RNA-binding protein
-157.052	4032682	4043609	BGV006775_03g031730.3	Solyc03g031730	Beta-glucosidase
-148.251	4048940	4052410	BGV006775_03g031740.2	Solyc03g031740	Glucose-6-phosphate/phosphate-translocator
-125.935	4071122	4074726	BGV006775_03g031750.2	Solyc03g031750	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog
-115.987	4081073	4084674	BGV006775_03g031760.3	Solyc03g031760	Homeobox-leucine zipper protein HDG2-like
-113.024	4085205	4087637	BGV006775_00g099580.2	N/A	N/A
-80.89	4116561	4119771	BGV006775_03g031770.3	Solyc03g031770	CRIB domain-containing protein RIC10
-76.224	4122464	4124437	BGV006775_03g031780.3	Solyc03g031780	nuclear polyadenylated RNA-binding protein 3-like isoform X1
-72.622	4127017	4128039	BGV006775_03g031790.1	Solyc03g031790	Oligosaccharyltransferase complex/magnesium transporter family protein
-65.477	4132793	4135184	BGV006775_03g031800.3	Solyc03g031800	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
-48.794	4137162	4151867	BGV006775_03g031820.3	Solyc03g031820	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
-43.032	4156892	4157629	BGV006775_03g031830.1	Solyc03g031830	RING/U-box superfamily protein

-36.995	4160940	4163666	BGV006775_03g031840.3	Solyc03g031840	expansin precursor 3
-34.851	4164728	4165810	BGV006775_03g031850.1-c2	Solyc03g031850	PC-Esterase
-20.148	4174731	4180513	BGV006775_03g031860.3	Solyc03g031860	Phytoene synthase 1
-13.594	4183949	4187067	BGV006775_03g031870.2	Solyc03g031870	AMP-dependent synthetase/ligase
-4.754	4190155	4195907	BGV006775_03g031880.3	Solyc03g031880	Lysine-specific histone demethylase 1
-0.131	4198043	4200530	BGV006775_03g031890.3	Solyc03g031890	Cold induced protein-like
4.251	4204912	4205235	BGV006775_06g061215.1	N/A	N/A
11.11	4211771	4216592	BGV006775_03g031900.2	Solyc03g031900	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
16.517	4217178	4222519	BGV006775_03g031910.3	Solyc03g031910	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase
23.903	4224564	4231043	BGV006775_03g031920.3	Solyc03g031920	Metal-nicotianamine transporter YSL
49.763	4250424	4253646	BGV006775_03g031940.3	Solyc03g031940	AMP-dependent synthetase/ligase
66.461	4267122	4272862	BGV006775_03g031950.2	Solyc03g031950	transmembrane protein
94.655	4295316	4303950	BGV006775_03g031970.3	Solyc03g031970	Auxin response factor
103.725	4304386	4307474	BGV006775_03g031980.3	Solyc03g031980	Lectin-receptor kinase
114.449	4315110	4319789	BGV006775_03g031990.3	Solyc03g031990	Auxin efflux carrier
134.974	4335635	4339341	BGV006775_03g032000.3	Solyc03g032000	Thioredoxin reductase
140.515	4341176	4343931	BGV006775_03g032010.3	N/A	N/A
149.639	4350300	4353776	BGV006775_03g032020.3	Solyc03g032020	3-hydroxy-3-methylglutaryl- coenzyme A reductase 3
151.457	4352118	4353031	BGV006775_03g032025.1	N/A	N/A
167.089	4367750	4374044	BGV006775_03g032030.3	Solyc03g032030	Phosphate carrier protein mitochondrial-like
194.103	4394764	4396532	BGV006775_03g032035.1	N/A	N/A
195.956	4396617	4400957	BGV006775_03g032040.3	Solyc03g032040	Tonoplast monosaccharide transporter 1
201.043	4401704	4410987	BGV006775_03g032050.3	Solyc03g032050	Ras-related protein Rab-11A
211.564	4412225	4412761	BGV006775_03g032060.1	Solyc03g032060	RING/U-box superfamily protein
233.045	4433706	4439458	BGV006775_03g032080.3	Solyc03g032080	Auxin efflux carrier
250.61	4451271	4452554	BGV006775_03g032090.1	Solyc03g032090	Amino acid transporter
254.128	4454789	4457969	BGV006775_03g032100.2	Solyc03g032100	PHD finger-like protein
259.295	4459956	4473049	BGV006775_03g032110.2	Solyc03g032110	RBI-inducible coiled-coil protein
276.64	4477301	4478827	BGV006775_03g032130.3	Solyc03g032130	High mobility group family
285.337	4485998	4489113	BGV006775_03g032140.3	Solyc03g032140	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, putative, expressed
293.992	4494653	4500223	BGV006775_03g032150.3	Solyc03g032150	Protein kinase domain

299.599	4500260	4510609	BGV006775_03g032160.3	Solyc03g032160	Ubiquitin domain-containing protein DSK2b
315.448	4516109	4516490	BGV006775_03g032170.2	Solyc03g032170	Unknown protein
319.546	4520207	4529356	BGV006775_03g032180.3	Solyc03g032180	Poly(A) polymerase I
331.291	4531952	4535690	BGV006775_03g032190.3	Solyc03g032190	cyclinB2_7
349.692	4550353	4551429	BGV006775_09g009310.1	N/A	N/A
354.547	4555208	4555408	BGV006775_08g082600.1-c23	N/A	N/A
361.695	4562356	4565249	BGV006775_03g032210.3	Solyc03g032210	AMP-dependent synthetase/ligase
381.249	4581910	4584734	BGV006775_03g032220.3	Solyc03g032220	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
393.964	4594625	4595641	BGV006775_03g032230.1	Solyc03g032230	Heat shock protein 90-1
409.442	4610103	4614110	BGV006775_03g032240.3	Solyc03g032240	cation/H(+) antiporter 2-like
416.074	4616735	4618736	BGV006775_03g032245.1	N/A	N/A
443.847	4644508	4644921	BGV006775_03g033250.1	N/A	N/A
447.127	4647788	4652639	BGV006775_03g033260.3	N/A	N/A
451.989	4652650	4654513	BGV006775_03g033270.3	N/A	N/A
463.824	4664485	4664895	BGV006775_03g033280.1	Solyc03g033280	Tracheary element differentiation-related 6
465.97	4666631	4666999	BGV006775_03g033290.1	Solyc03g033290	Tracheary element differentiation-related 6
471.117	4671778	4672329	BGV006775_08g006256.1-c9	N/A	N/A
471.195	4671856	4674814	BGV006775_07g004997.1-c2	N/A	N/A
491.197	4691858	4694378	BGV006775_03g033300.2	Solyc03g033300	Ammonium transporter
493.938	4694599	4699120	BGV006775_03g033310.3	Solyc03g033310	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein

(b) マーカー BGV1.3ch09_54463263 近傍候補領域 (BGV1.3 ch05: 1 - 700,017) 上の遺伝子

N/A: *Solanum lycopersicum* リファレンスゲノム SL4.0 上に該当遺伝子なし

Distance from the marker (Kb)	Start position	End position	Gene ID (BGV1.3)	Gene ID (SL4.0)	Annotation (ITAG4.0)
-198.854	520	1163	BGV006775_08g007711.1-c3	N/A	N/A
-180.579	16028	19438	BGV006775_05g005010.3	Solyc05g005010	NEP-interacting protein, putative (DUF239)
-110.614	85412	89403	BGV006775_05g005000.3	Solyc05g005000	Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
-97.301	99251	102716	BGV006775_05g005010.3-c2	N/A	N/A
-65.389	116019	134628	BGV006775_05g005020.3	Solyc05g005020	Alpha-Glucan Water Dikinase
-63.386	135422	136631	BGV006775_05g005030.3	Solyc05g005030	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein
-53.964	141486	146053	BGV006775_05g005040.3	Solyc05g005040	Pectin lyase-like superfamily protein
-48.445	149601	151572	BGV006775_05g005050.3	Solyc05g005050	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3
-46.749	151727	153268	BGV006775_05g005060.3	Solyc05g005060	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3
-37.84	158378	162177	BGV006775_05g005070.2	Solyc05g005070	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 2
-30.787	164710	169230	BGV006775_05g005080.3	Solyc05g005080	Endoglucanase
-20.969	170379	179048	BGV006775_05g005090.3	Solyc05g005090	LEU76408 knotted 3
-5.888	189709	194129	BGV006775_05g005100.3	Solyc05g005100	Protein trichome birefringence
0	194950	200118	BGV006775_05g005120.3	Solyc05g005120	Unknown protein
2.695	202712	206237	BGV006775_05g005130.2	Solyc05g005130	Prf
9.808	209825	215192	BGV006775_05g005140.3	Solyc05g005140	Protein NSP-INTERACTING KINASE 3
19.206	219223	220335	BGV006775_05g005150.1	Solyc05g005150	F-box/Kelch repeat-containing F-box family protein
24.394	224411	228307	BGV006775_05g005160.3	Solyc05g005160	ATP-citrate synthase
42.401	242418	245546	BGV006775_05g005170.3	Solyc05g005170	Pectin lyase-like superfamily protein
48.032	248049	252089	BGV006775_05g005180.3	Solyc05g005180	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase
52.699	252716	256019	BGV006775_05g005190.3	Solyc05g005190	ADP-ribosylation factor
56.582	256599	260616	BGV006775_05g005200.3	Solyc05g005200	Pyrrolidone-carboxylate peptidase-like protein
62.464	262481	267445	BGV006775_05g005210.3	Solyc05g005210	SBP (S-ribonuclease binding protein) family protein
70.802	270819	271595	BGV006775_05g005220.1-c2	Solyc05g005220	Unknown protein
72.519	272536	273528	BGV006775_05g005230.3	Solyc05g005230	Plant protein 1589 of Uncharacterized protein function
74.977	274994	277314	BGV006775_05g005240.2	Solyc05g005240	YABBY gene

77. 448	277465	287300	BGV006775_05g005250. 3	Solyc05g005250	pantothenate kinase family protein AB211526
92. 046	292063	301753	BGV006775_05g005260. 2	Solyc05g005260	DNA ligase 1-like
110. 272	310289	314356	BGV006775_05g005280. 3	Solyc05g005280	Poly [ADP-ribose] polymerase
114. 637	314654	317551	BGV006775_05g005290. 3	Solyc05g005290	Poly [ADP-ribose] polymerase
123. 115	323132	325619	BGV006775_05g005300. 2	Solyc05g005300	bHLH transcription factor 084
128. 575	328592	329275	BGV006775_05g005310. 2	Solyc05g005310	NEDD8-specific protease 1
133. 298	333315	333794	BGV006775_05g005320. 1	Solyc05g005320	Unknown protein
144. 655	344672	353346	BGV006775_05g005330. 3	Solyc05g005330	Disease resistance protein
161. 381	361398	365883	BGV006775_05g005337. 1	N/A	N/A
170. 319	370336	370911	BGV006775_05g005360. 2-c2	N/A	N/A
175. 851	375868	376443	BGV006775_05g005360. 2-c3	Solyc05g005360	Nuclear transcription factor Y subunit B-9
180. 568	380585	381813	BGV006775_05g005380. 2	Solyc05g005380	Nuclear factor Y, subunit B6
184. 201	384218	392955	BGV006775_05g005385. 1	N/A	N/A
199. 605	399622	400080	BGV006775_05g005390. 2	Solyc05g005390	Nuclear factor Y, subunit B6
200. 953	400970	404269	BGV006775_05g005400. 2	Solyc05g005400	F-box family protein
207. 64	407657	408896	BGV006775_05g005405. 1	N/A	N/A
209. 651	409668	411095	BGV006775_05g005410. 1	Solyc05g005410	F-box family protein
213. 298	413315	415028	BGV006775_05g005420. 2	Solyc05g005420	F-box family protein
215. 727	415744	417525	BGV006775_05g005430. 2	Solyc05g005430	F-box family protein
218. 48	418497	419027	BGV006775_05g005440. 2	Solyc05g005440	Nuclear factor Y, subunit B6
226. 153	426170	426810	BGV006775_05g005450. 2	Solyc05g005450	Suppressor of Gene Silencing 3
229. 446	429463	437636	BGV006775_05g005460. 3	Solyc05g005460	DC1 domain-containing protein
238. 683	438700	441494	BGV006775_05g005470. 3	Solyc05g005470	DC1 domain-containing protein
242. 472	442489	445892	BGV006775_05g005480. 2	Solyc05g005480	Quinone oxidoreductase-like protein
246. 256	446273	451796	BGV006775_05g005490. 3	Solyc05g005490	carbonic anhydrase
256. 886	456903	457070	BGV006775_05g005500. 1	Solyc05g005500	Unknown protein
258. 473	458490	461285	BGV006775_05g005510. 3	Solyc05g005510	Nucleic acid-binding, OB-fold protein
262. 677	462694	465746	BGV006775_05g005530. 3	Solyc05g005530	Tetraspanin family protein
270. 424	470441	472436	BGV006775_05g005535. 1	N/A	N/A
270. 576	470593	473343	BGV006775_05g005540. 3	Solyc05g005540	Polygalacturonase-1 non-catalytic subunit beta
275. 258	475275	477795	BGV006775_05g005550. 3	Solyc05g005550	BURP domain
292. 855	492872	495438	BGV006775_05g005560. 4	Solyc05g005560	polygalacturonase isoenzyme 1 beta subunit

298.074	498091	501245	BGV006775_05g005570.3	Solyc05g005570	BURP domain
306.065	506082	508854	BGV006775_05g005580.3	Solyc05g005580	DUF936 domain-containing protein
310.23	510247	515795	BGV006775_05g005590.3	Solyc05g005590	Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN
316.939	516956	524717	BGV006775_05g005610.3	Solyc05g005610	HD domain-containing metal-dependent phosphohydrolase family protein
321.689	521706	530108	BGV006775_05g005620.3	Solyc05g005620	RNA-binding protein 25-like
331.26	531277	543202	BGV006775_05g005630.3	Solyc05g005630	Ubiquitin-like-specific protease 1D
347.965	547982	548467	BGV006775_11g038340.1	N/A	N/A
353.237	553254	553409	BGV006775_05g023775.1-c2	N/A	N/A
356.531	556548	556895	BGV006775_10g017890.1	N/A	N/A
357.409	557426	557761	BGV006775_11g045440.1	N/A	N/A
359.299	559316	559837	BGV006775_05g018790.1	N/A	N/A
374.625	574642	582434	BGV006775_05g005640.3	Solyc05g005640	methyl-CpG-binding domain-containing protein 9-like
384.296	584313	596324	BGV006775_05g005650.2	Solyc05g005650	methyl-CpG-binding domain-containing protein 9 isoform X1
404.207	604224	606553	BGV006775_05g005660.1	Solyc05g005660	Concanavalin A-like lectin/glucanase domain-containing protein
407.032	607049	609097	BGV006775_05g005670.1	Solyc05g005670	RING-type E3 ubiquitin transferase
417.265	617282	618863	BGV006775_05g005680.3	Solyc05g005680	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
419.398	619415	620020	BGV006775_05g005685.1	Solyc05g005685	Unknown protein
420.803	620820	621263	BGV006775_05g005690.1	Solyc05g005690	40S ribosomal protein S16
425.24	625257	629709	BGV006775_05g005700.3	Solyc05g005700	Aldehyde dehydrogenase
432.781	632798	633118	BGV006775_08g082600.1-c40	N/A	N/A
440.007	640024	644143	BGV006775_05g005710.3	Solyc05g005710	spermidine synthase, Pfam:PF01564
445.476	645493	649828	BGV006775_05g005720.3	Solyc05g005720	Potassium transporter
450.184	650201	653660	BGV006775_05g005730.3	Solyc05g005730	Rrp15p protein
453.683	653700	654180	BGV006775_05g005735.1	N/A	N/A
466.272	666289	671723	BGV006775_05g005740.3	Solyc05g005740	Potassium transporter
483.356	683373	690553	BGV006775_05g005750.3	Solyc05g005750	Trehalose-6-phosphate synthase
494.689	694706	697889	BGV006775_05g005760.3	Solyc05g005760	NHL domain-containing protein
499.385	699402	703451	BGV006775_05g005770.3	Solyc05g005770	NHL domain-containing protein

(c) マーカー BGV1.3ch09_54463263 近傍候補領域 (BGV1.3ch09: 53, 913, 263-54, 913, 263) 上の遺伝子

N/A: *Solanum lycopersicum* リファレンスゲノム SL4.0 上に該当遺伝子なし

Distance from the marker (Kb)	Start position	End position	Gene ID (BGV1.3)	Gene ID (SL4.0)	Annotation (ITAG4.0)
-295.56	54167509	54167703	BGV006775_09g059800.1	Solyc09g059800	Unknown protein
-244.734	54217812	54218529	BGV006775_09g059805.1	N/A	N/A
-243.754	54218762	54219509	BGV006775_09g059810.2	N/A	N/A
-243.231	54219585	54220032	BGV006775_09g059813.1	N/A	N/A
-210.7	54245565	54252563	BGV006775_09g061290.3	Solyc09g061290	Transcriptional corepressor LEUNIG
-137.247	54323735	54326016	BGV006775_09g061280.3	Solyc09g061280p27KIP1-related-protein 2	
-106.961	54344534	54356302	BGV006775_09g061270.3	Solyc09g061270	Unknown protein
-85.713	54374795	54377550	BGV006775_09g061260.1-c3	Solyc09g061260	Protein OBERON 1
12.105	54475368	54480532	BGV006775_09g061250.3	Solyc09g061250	BTB/POZ domain-containing protein
17.443	54480706	54483874	BGV006775_09g061230.3	Solyc09g061230	Cytochrome b5
21.464	54484727	54484894	BGV006775_01g099330.3-c25	N/A	N/A
56.248	54519511	54519768	BGV006775_10g074420.1-c2		
56.622	54519885	54520692	BGV006775_09g061220.1	N/A	N/A
99.343	54562606	54562848	BGV006775_05g026170.1-c3	N/A	N/A
320.949	54784212	54784868	BGV006775_09g060183.1	N/A	N/A
377.725	54840988	54841553	BGV006775_09g066030.2	Solyc09g066030	homeobox-leucine zipper protein ROC8
410.298	54873561	54877181	BGV006775_09g057567.1-c3	N/A	N/A
475.387	54938650	54939840	BGV006775_09g060180.2-c2	Solyc09g060180	Unknown protein
496.815	54960078	54981071	BGV006775_08g062510.3-c5	N/A	N/A

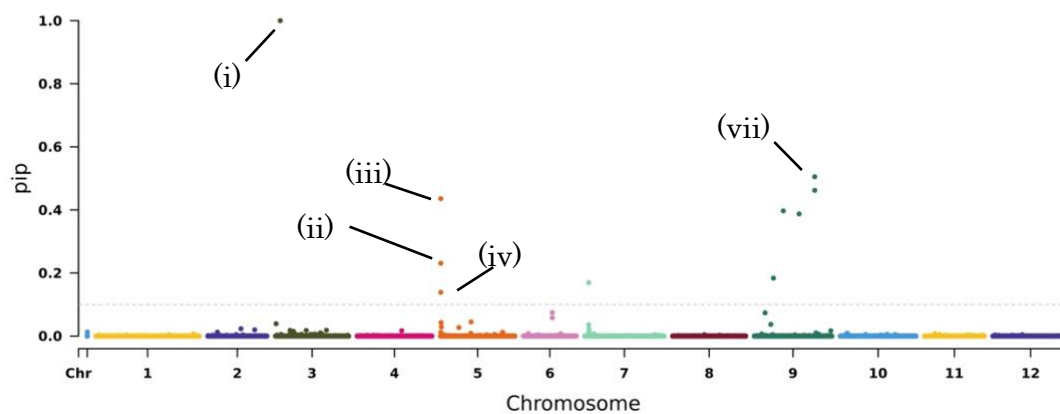
表 3-2 第 3 染色体上の候補マーカー (BGV1. 3ch03_4200661) 近傍のうちマーカー間で有意に発現の異なる遺伝子

Gene	mean in A (FPKM)	mean in R (FPKM)	log2FC (A/R expression)	p-value	Annotation (ITAG 4.0)
Solyc03g031870	90.96353718	1.199776953	6.244450226	5.40E-42	AMP-dependent synthetase/ligase
Solyc03g031670	35.65044871	30.29173235	0.234996148	0.017308262	calcium-dependent protein kinase
Solyc03g031970	16.80785618	20.06260317	-0.255373089	0.027260796	Auxin response factor
Solyc03g032240	0.446343765	0.597932333	-0.421826955	0.035278243	cation/H(+) antiporter 2-like
Solyc03g031860	2613.365012	3805.769112	-0.542279397	0.035731497	Phytoene synthase 1
Solyc03g031560	1.333777412	1.640202349	-0.298355887	0.035774294	UDP-3-O-acylglucosamine N- acyltransferase
Solyc03g031990	0.150995059	0.241343996	-0.676589598	0.046937675	Auxin efflux carrier

表 3-3 第 5 染色体上の候補マーカー (BGV1.3ch05_200017) 近傍のうちマーカー間で有意に発現の異なる遺伝子

Gene	mean in A (FPKM)	mean in R (FPKM)	log2FC (A/R expression)	p-value	Annotation (ITAG 4.0)
Solyc05g005250	85.3543071	46.33621596	0.881323724	6.84E-13	pantothenate kinase family protein AB211526
Solyc05g005170	2.0607962	0.081854668	4.653993338	2.76E-09	Pectin lyase-like superfamily protein
Solyc05g005290	22.4265842	108.9046558	-2.279783827	2.39E-08	Poly [ADP-ribose] polymerase
Solyc05g005710	253.0271836	166.7274076	0.601801104	2.06E-07	spermidine synthase, Pfam:PF01564
Solyc05g005140	0.719814	0.274201346	1.392388508	1.04E-05	Protein NSP-INTERACTING KINASE 3
Solyc05g005050	1.8160595	0.331420983	2.454074622	1.13E-05	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3
Solyc05g005490	331.0296265	457.0009988	-0.465236977	1.60E-05	carbonic anhydrase
Solyc05g005160	30.4745941	13.9257638	1.129850547	4.25E-05	ATP-citrate synthase
Solyc05g005060	3.0643647	0.776480808	1.980565836	0.00012027	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3
Solyc05g005460	14.0637792	48.1652024	-1.776006903	0.00153906	DC1 domain-containing protein
Solyc05g005020	38.2879519	31.54830752	0.279327879	0.011418597	Alpha-Glucan Water Dikinase
Solyc05g005590	5.0098336	6.061791136	-0.274981458	0.013180936	Dual-specificity RNA methyltransferase RlmN
Solyc05g005120	1.394081	1.948668119	-0.483174015	0.023856632	Unknown protein
Solyc05g005300	0.0948817	0.224367161	-1.241659769	0.025684378	bHLH transcription factor 084
Solyc05g005330	0.9084009	1.343862972	-0.564985	0.033010935	Disease resistance protein
Solyc05g005150	0.3557039	0.046463923	2.936493917	0.03646072	F-box/Kelch repeat-containing F-box family protein
Solyc05g005240	0.0895038	0.316088629	-1.820308298	0.038141584	YABBY gene
Solyc05g005180	4.0546659	2.870973084	0.498043238	0.040169398	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase

(a) カロテノイド総量



(b) リコペン

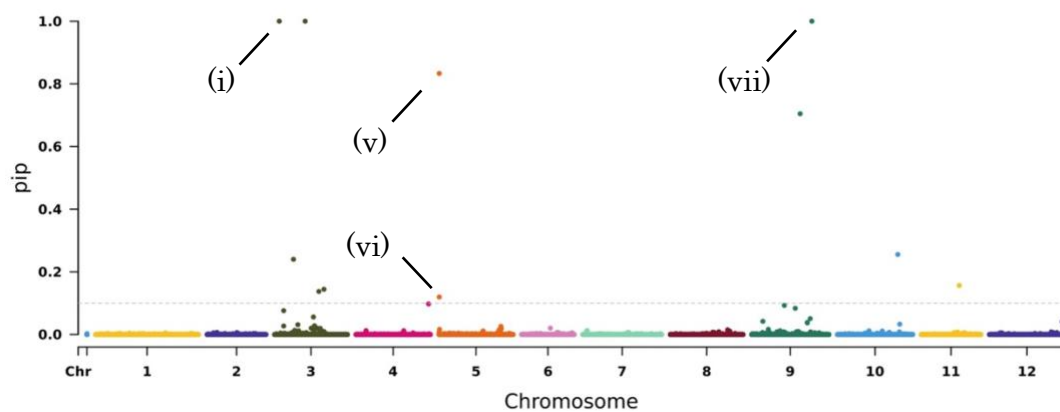


図 3-1 ゲノムワイド関連解析(GWAS)に基づくマンハッタンプロット

(a) カロテノイド総量, (b) リコペンについて、横軸はトマトの染色体を、縦軸は事後包含確率 (posterior inclusion probability, pip) をそれぞれ示す。図中の破線は有意水準 ($\text{pip} > 0.1$) を示す。(i)-(vii)は本研究にて着目した SNP マーカーを示す。(i): BGV1.3ch03_4200661, (ii): BGV1.3ch05_201158, (iii): BGV1.3ch05_201192, (iv): BGV1.3ch05_206375, (v): BGV1.3ch05_197364, (vi): BGV1.3ch05_200017 (vii): BGV1.3ch09_54463263

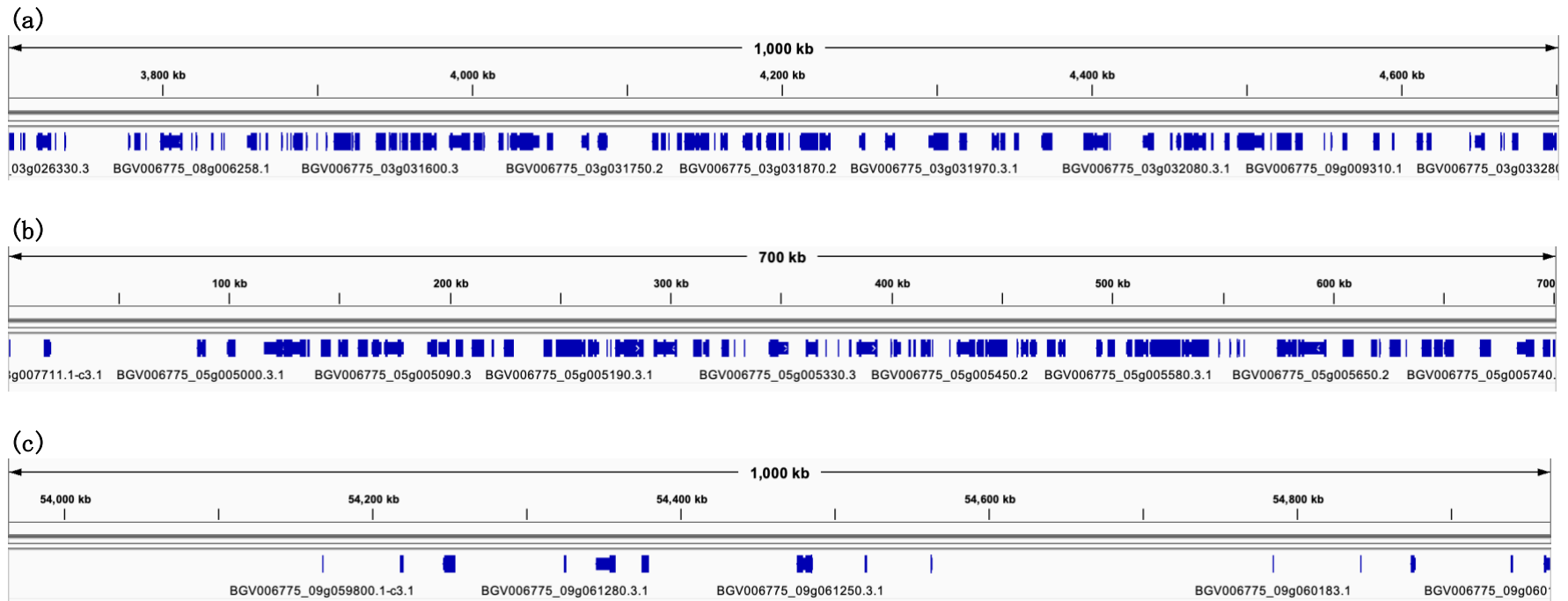


図 3-2 本研究にて着目した SNP マーカーの近傍領域

リファレンスゲノム” BGV006775” 上の当該領域を Integrative Genome Viewer (IGV) によって可視化した。

(a) BGV1.3ch03_4200661 の上流・下流 500 kb (BGV1.3ch03: 3,700,661-4,700,661)

(b) BGV1.3ch05_200017 の染色体末端までの上流約 200 kb および下流 500 kb (BGV1.3 ch05: 1 - 700,017)

(c) BGV1.3ch09_54463263 の上流・下流 500 kb (BGV1.3ch09: 53,913,263-54,913,263)

Solyc05g005160

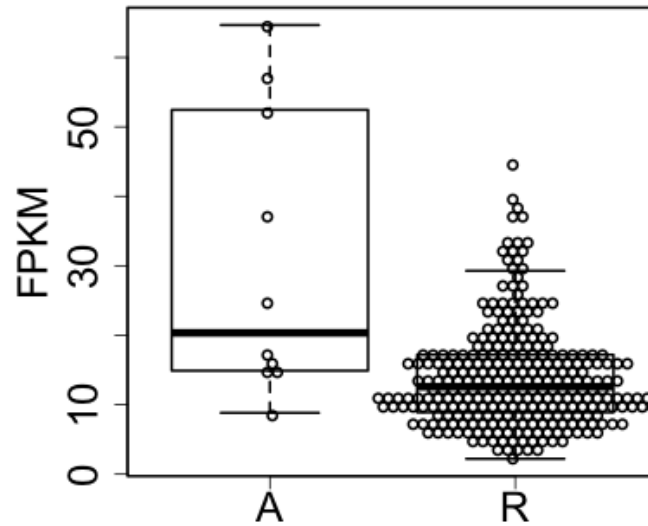


図 3-3 選抜した候補遺伝子 Solyc05g005160 (ATP-citrate synthase) のマーカーごとの発現

対立マーカーを持つ系統 (A, $n = 10$) とリファレンスマーカーを持つ系統 (R, $n = 286$) との間で発現量 (FPKM) を比較した。

ボックスの下限と上限はそれぞれ第 1 および第 3 四分位数を示し、中央の線は中央値を示す。ひげは下位または上位四分位数の 1.5 倍の四分位範囲を表す。蜂群図は各系統の個別の遺伝子発現を示す。

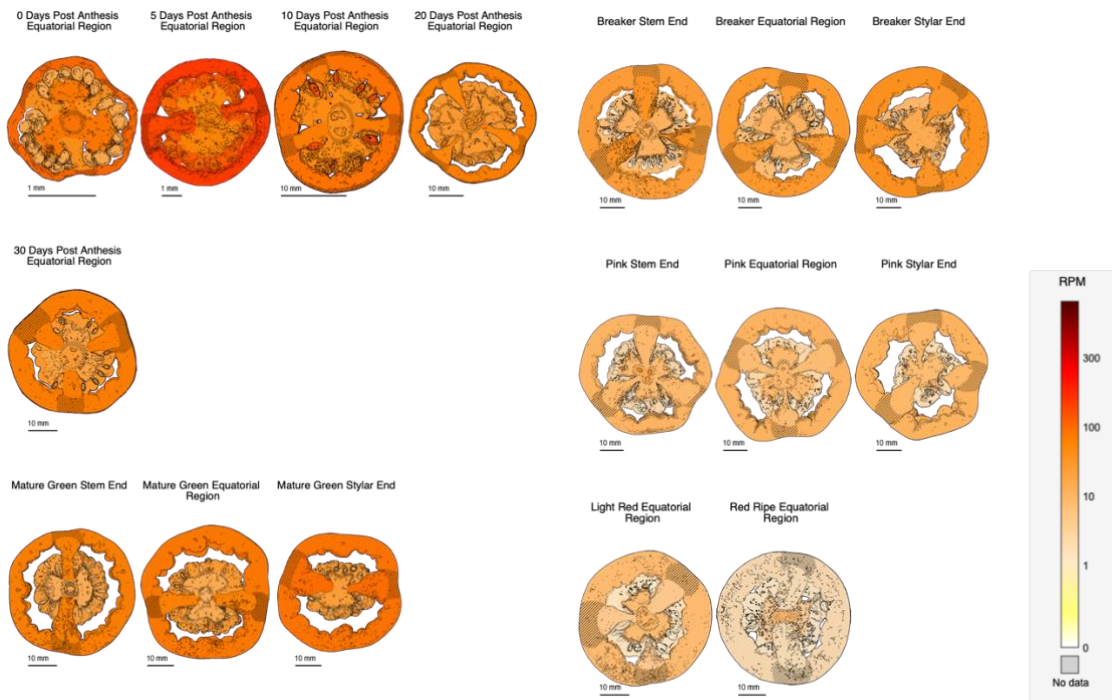


図 3-4 Solyc05g005160 (ATP-citrate synthase) のトマト系統 “M82” 果実中での果実発達段階別および部位別の発現

受粉後 0、5、10、20、30 日後 (days post anthesis, DPA) および mature green、breaker、pink、light red、red ripe の各時期における果実中の部位ごとの遺伝子発現を示す。画像は Tomato Expression Atlas の Expression Viewer (https://tea.solgenomics.net/expression_viewer/) を用いて作製した。

RPM: read per million

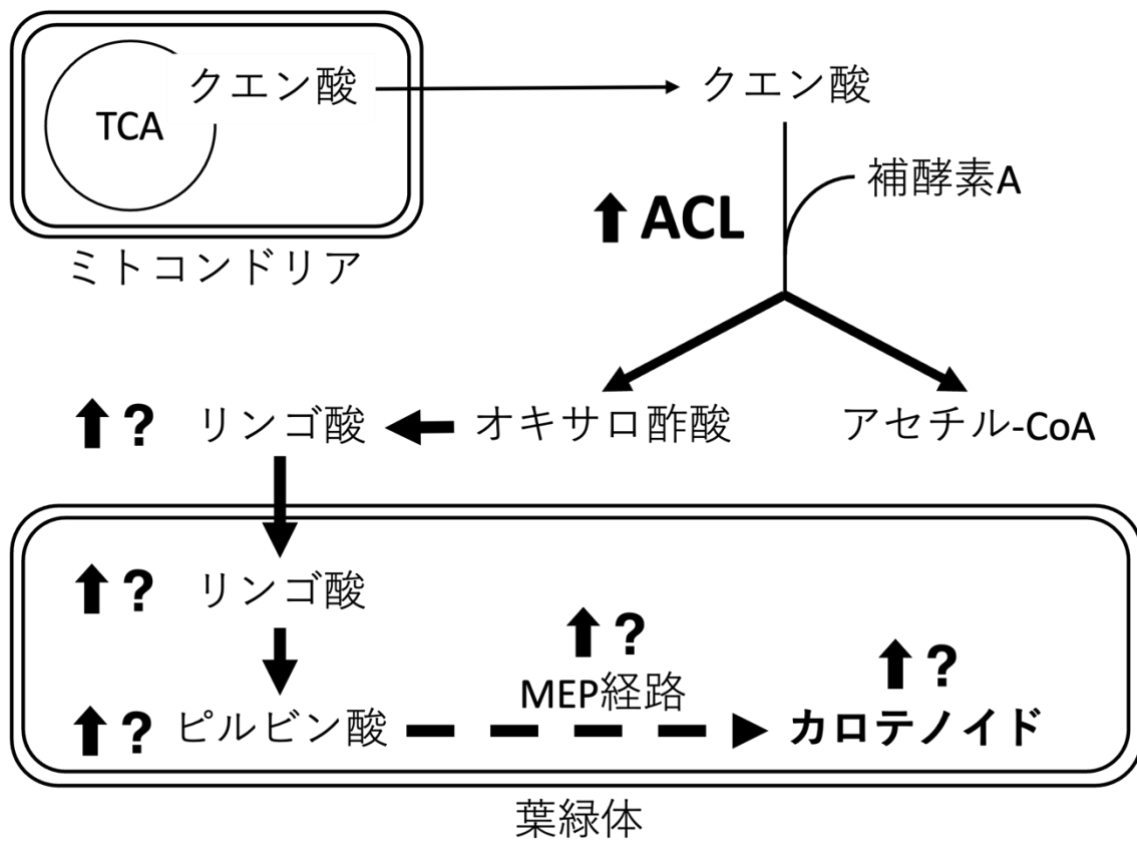


図 3-5 ATP-クエン酸シンターゼ (ACL) の発現上昇を介したカロテノイド含量上昇モデル

総括

本研究では、アポカロテノイド香気成分の前駆体であるカロテノイドと、光合成に関与し果実中の糖含量にも寄与しうるクロロフィルに着目し、両者それぞれがトマト果実のフレーバーに与える影響を解明することを目的とした。

第 1 章では、トマトのフレーバー改善に向けた研究の現状と、本研究の目的と意義を述べた。トマトは主に食用として栽培や消費が行われ、その商品価値を構成する要素として食味、特に味覚と嗅覚の相互作用からなるフレーバーが非常に重要である。これまでの研究において、トマト果実中に含まれヒトの味覚や嗅覚に作用する物質の同定、官能試験を通じたそれらの物質の官能特性の評価、それらの物質の果実中での生合成メカニズムや含量制御メカニズムの解明を目指した研究が数多く行われてきた。中でも、近年は栽培種のみならず、野生種トマトの遺伝的解析を行うことで、フレーバーに重要な化合物の生合成や含量制御に関与する新規遺伝子の同定、メカニズムの解明が進められてきた。栽培種トマトは原産地であるアンデス地域から人為的に持ち出されることにより、世界中で広く栽培や消費が行われるようになったが、その過程で” Domestication syndrome ” と呼ばれる表現型の画一化と、遺伝的多様性の著しい減少を経験した。一方、野生種は栽培化以前に存在していた多様な遺伝子を保持していると考えられている。実際に野生種ゲノム中から有用遺伝子が同定されつつある。しかし、一部の香気成分、特に甘い香りを呈するアポカロテノイド香気成分の生合成制御に関する知見はまだ十分ではない。このような背景から、本研究では栽培種のみならず野生種を研究対象とし、トマトのフレーバーの制御メカニズムの解明と、フレーバーに重要な化合物の含量制御に関わる遺伝子を同定することを目的とした。

第 2 章では、トマト果実中のカロテノイドがアポカロテノイド香気成分の含量に与える影響を解明すること、また果実中の糖生産に対する果実中クロロフィルの関与を

解明するために、栽培種および野生種トマトの果実中に含まれるクロロフィルおよびカロテノイドの定量を行った。本研究では計 362 系統の測定を迅速に達成するために、マイクロプレートリーダーを用いたクロロフィルとカロテノイドの簡便な同時測定法の最適化を行った。HPLC を用いたクロロフィルとカロテノイドの同時分析は二相分離や濃縮等の前処理に加え、成分の分離のために 60 分程度の保持時間を必要とする。本法ではアセトンによる一層抽出を採用することで前処理を簡略化した。加えて、各成分に特徴的な吸収波長を測定することでクロロフィルとカロテノイドの定量をクロマトグラフによる分離を介さずに行うことで、測定の迅速化を達成した。これにより HPLC 法と比べ大幅な測定の簡略化を達成できた。

また、本法を用いて得られたカロテノイドの定量値とアポカロテノイド香気成分含量を組み合わせることで、*“Dixie Golden Giant”* の果実中では前駆体であるカロテノイドが少ないにも関わらずアポカロテノイド香気成分が多いことを見出し、HPLC によるさらなる測定によって本系統がプロリコペン蓄積していることを明らかにした。このことは、HPLC を用いたカロテノイドのプロファイリングを行わずに、総量の測定によるスクリーニングのみで特徴的な系統を見出すことができた好例である。また、先行研究にてこの *“Dixie Golden Giant”* は CRTISO 欠損変異体であることが明らかになっており、また本系統と同様に CRTISO 変異体である tangerine 系統でもアポカロテノイド香気成分のひとつである MHO の含量の増大が見られることから、本系統が持つ機能欠損型の CRTISO がプロリコペン蓄積と MHO 含量増大の原因であることが推察された。今後の展望として、CRTISO の機能欠損を通じた MHO 含量の増大が食味を向上させるか官能試験等によって評価すること、また食味以外の栽培形質に悪影響を及ぼしていないかを評価することで、本遺伝子が育種において有用であるかどうかを確認する必要があると考えられる。

本章ではさらに、成熟したトマト果実中にクロロフィルが残存することが、糖含量と関連しうることを示唆する結果が得られた。しかし、本研究ではあくまで成熟果実中にクロロフィルが残存する系統では糖含量が高い傾向があることを示唆するに留まり、具体的にどのようなメカニズムによって糖含量が上昇するかを明らかにすることはできなかった。しかし、これは先行研究にて述べられている機能型 *SIGLK2* によって生じるグリーンショルダー形質が糖含量を高めるという仮説を支持する結果である可能性が高いと考えられる。これを明らかにするためには、該当系統における *SIGLK2* の遺伝型の特定を行う必要がある。

第3章では、カロテノイドの含量制御を通じてフレーバー化合物の含量に影響しうる遺伝子座の特定を目的とし、トマト果実中のカロテノイド総量とリコペン含量を基にGWASを行った。さらに、GWASで検出されたマーカー近傍の遺伝子について、果実中の遺伝子発現を解析し、リファレンスマーカーまたは対立マーカーを持つ系統間での発現量を比較した。

第5染色体上に検出されたマーカーについて、マーカー間で有意に発現が異なる遺伝子からアノテーションに基づいて検討し、ATP-citrate synthase (Solyc05g005160) を候補遺伝子として選抜した。本遺伝子はカロテノイドの前駆体を合成するMEP経路の上流に位置することから、本遺伝子の発現上昇によりカロテノイド前駆体の生合成が促進され、結果としてカロテノイドの含量増加に繋がる可能性が考えられる。

今後の展望として、今回確認された発現量の違いの原因を特定すべく、マーカー近傍のゲノム配列の多型を解析する必要がある。また、本遺伝子の過剰発現系統を作出することにより、本遺伝子の発現上昇が実際にカロテノイド含量の増加に寄与するか、またカロテノイドが増加した場合にアポカロテノイド香気成分もまた増加するのか、その他の栽培形質に影響を及ぼさないかなどを明らかにすることで、本遺伝子がフレ

ーパーの改善に寄与する栽培上有用なものであるかを検討することが必要である。

本研究は、トマト果実中の色素に着目し、果実の甘味の制御に関わるメカニズムを明らかにすることを目指した。その結果、アポカロテノイド香気成分の含量制御に係る知見として、*all-trans* リコペンに代わりプロリコペンを蓄積する CRTISO 欠損系統では甘い香りを呈するアポカロテノイド香気成分の含量が増加する可能性が示唆された。また、成熟果実にクロロフィルが残存する系統において果実中の糖含量が高い傾向がある可能性が示唆された。また、アポカロテノイド香気成分の前駆体であるカロテノイドの含量を増加させる遺伝子の候補として ATP-citrate synthase (Solyc05g005160) を選抜した。第 1 章で述べたとおり、果実サイズと糖度の両立には限界があるとされてきた。しかし、トマトの糖生産や香気成分生産に関わるメカニズムの解明やそのメカニズムに関与する遺伝子の同定が進めば、商用の大型トマトにもさらなる甘味を付与することが可能となり、商品価値の向上につながると考えられる。本研究の成果がその一助となれば幸いである。

要旨

トマトは世界中で広く栽培、消費が行われる重要な作物のひとつであり、さらなる品種改良に向けて、機能性成分含量やストレス耐性などの制御に関わる遺伝子を同定することは非常に重要である。

第1章では、トマトのフレーバー改善に向けた研究の現状と、本研究の目的と意義を述べた。近年、栽培種である *Solanum lycopersicum* に加え、交配可能な近縁野生種 (*S. pimpinellifolium* や *S. pennellii* など) を研究材料に含めた大規模な遺伝資源の探索が盛んに行われている。これらの近縁野生種は栽培種よりも遺伝的背景が多様であり、栽培種を用いた研究では発見されなかった有用遺伝子を野生種ゲノムより同定し、栽培種に導入することで育種の発展に貢献することが期待される。食味に関しても同様に、良食味に関わる遺伝子の探索および含量制御メカニズムの解明を目指した研究が行われている。過去に実施された官能試験の結果から、トマト果実中に含まれる糖、有機酸、香気成分などの代謝物のうち、実際にヒトの味覚と嗅覚で感知され、フレーバーに寄与するものはおよそ 30 種類程度だといわれている。中でも、甘い香りを呈する揮発性化合物群としてアポカロテノイド香気成分が挙げられる。先行研究にてその生合成メカニズムや、含量制御に関わる遺伝子の探索が行われている。しかし、発見された候補遺伝子の機能の多くは未解明であり、含量上昇に繋がるメカニズムも十分に研究されていない。食味に関わる化合物群のうち、アポカロテノイド香気成分は前駆体であり赤黄色色素でもあるカロテノイドの生合成の増加に伴い放出量が増大する。また、成熟が進行してもヘタの周囲で葉緑体およびクロロフィル含有量が維持されるために緑色の領域が残る” Green shoulder” と呼ばれる形質が存在する。先行研究にて、Green shoulder 形質の原因遺伝子である *SIGLK2* の過剰発現系統において、果実中の糖含量が増加することが明らかになっており、果実中に長く残存するクロロフィル

含有量と高糖度化との関連性が示唆されている。このように、トマトの果実中に存在する色素であるカロテノイドやクロロフィルは食味に関わる成分の生産に非常に深く関わっている可能性があるが、これら色素と食味に関わる成分との量的関係は十分に解析されていない。そこで本研究では、トマトの果実色、特に光合成に関わるクロロフィルと香り成分の前駆体であるカロテノイドに着目し、それら色素と糖および香り成分の量的・質的關係を解析することで、色素含量の増減が食味に与える影響を明らかにすることを目的とした。次に、栽培種および野生種トマトのゲノム解析により、色素の増減を通じて食味に影響を与えうる遺伝子を同定することを目的とした。

第2章では、栽培種・野生種トマト (*S. lycopersicum*, *S. l. ver. cerasiforme* および *S. pimpinellifolium*) の果実中クロロフィルおよびカロテノイド含量を測定し、157 系統について過去に測定された糖および香り成分の含量と組み合わせ両者の量的關係を解析した。その結果、緑色色素であるクロロフィルの果実中含量が上位 10% の系統で下位 10% よりもグルコースとフルクトースの含量が有意に高いことが判明した。また、カロテノイドの分解産物で甘い香りを呈するゲラニルアセトンおよび 6-メチル-5-ヘプテン-2-オン含量が高い系統にも関わらず、カロテノイド総量が低い系統が見いだされた。その系統のカロテノイド組成を HPLC で分析した結果、通常の赤色トマトで見られる all-*trans* リコペンの代わりに、その *cis* 異性体であるプロリコペンがこれらの系統で特異的に蓄積していることを明らかにした。

第3章では、色素含量の増減を通じて食味形質に影響を及ぼす遺伝子の特定を目指し、カロテノイドの定量値とゲノム配列を用いたゲノムワイド関連解析を行った。その結果、カロテノイド含量に有意に関連するマーカーを複数検出した。そのうち、第3染色体と第5染色体に検出された計2つのマーカーに着目し、マーカー近傍の遺伝子について果実中におけるマーカー間での発現量の差を解析し遺伝子の絞り込みを行った。

第 3 染色体上のマーカー近傍にはカロテノイド合成に関わる遺伝子の一つである *Phytoene synthase 1* が存在し、またマーカー間での発現量も有意に異なることから、本遺伝子が当該マーカーに連鎖するカロテノイド含量に影響する遺伝子であると推察された。また、第 5 染色体上のマーカー近傍に存在し、かつマーカー間で有意に発現が異なる遺伝子のうち、カロテノイド含量に影響を与える遺伝子の候補である *ATP-citrate lyase alpha-subunit 1 (ACL1)* を選抜した。

謝辞

本研究の遂行および本論文をまとめるにあたり、懇切なるご指導、ご校閲を賜りました、筑波大学 生命環境系 草野 都 教授に心より厚く御礼申し上げます。博士論文の審査に際し、ご校閲およびご指導をいただきました筑波大学 生命環境系 繁森 英幸 教授、柴 博史 教授、王 寧 助教に心から感謝を申し上げます。

筑波大学 生命環境系 棚瀬 京子 准教授、杉本 貢一 助教を始めとする蔬菜・花卉学研究室の皆様および東京農工大学大学院 グローバルイノベーション研究院 篠崎 良仁 特任助教に、サンプルを栽培および提供頂いたことを深くお礼申し上げます。

最後に、研究活動および研究室生活全般において大変お世話になりました代謝ネットワーク研究室および植物遺伝情報解析学研究室の皆様に、心から感謝致します。

引用文献

- Aflitos, S. et al.** (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum* section *Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J.* **80**: 136–148.
- Alagoz, Y., Nayak, P., Dhami, N., and Cazzonelli, C.I.** (2018). *cis*-carotene biosynthesis, evolution and regulation in plants: The emergence of novel signaling metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **654**: 172–184.
- Alonge, M., Soyk, S., Ramakrishnan, S., Wang, X., Goodwin, S., Sedlazeck, F.J., Lippman, Z.B., and Schatz, M.C.** (2019). Fast and accurate reference-guided scaffolding of draft genomes. *Genome Biol.* **20**: 224.
- Aono, Y., Asikin, Y., Wang, N., Tieman, D., Klee, H., and Kusano, M.** (2021). High-Throughput Chlorophyll and Carotenoid Profiling Reveals Positive Associations with Sugar and Apocarotenoid Volatile Content in Fruits of Tomato Varieties in Modern and Wild Accessions. *Metabolites* **11**: 398.
- Bai, Y. and Lindhout, P.** (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes : What have We Gained and What Can We Gain in the Future ? *Ann. Bot.* **100**: 1085–1094.
- Balcke, G.U., Bennewitz, S., Bergau, N., Athmer, B., Henning, A., Majovsky, P., Jiménez-Gómez, J.M., Hoehenwarter, W., and Tissier, A.** (2017). Multi-omics of tomato glandular trichomes reveals distinct features of central carbon metabolism supporting high productivity of specialized metabolites. *Plant Cell* **29**: 960–983.
- Bauchet, G. and Causse, M.** (2012). Genetic Diversity in Tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its Wild Relatives. In *Genetic diversity in plants*, M. Çalışkan, ed (InTechOpen), pp. 133–162.
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M.J., Francis,**

- D., Causse, M., van der Knaap, E., and Cañizares, J.** (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics* **16**: 1–19.
- Bolger, A. et al.** (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nat. Genet.* **46**: 1034–1038.
- Cazzonelli, C.I. and Pogson, B.J.** (2010). Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **15**: 266–274.
- Cocaliadis, M.F., Fernández-muñoz, R., Pons, C., Orzaez, D., and Granell, A.** (2014). Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword? *J. Exp. Bot.* **65**: 4589–4598.
- Coyago-cruz, E., Corell, M., Moriana, A., Mapelli-brahm, P., Hernanz, D., Stinco, C.M., Beltrán-sinchiguano, E., and Meléndez-martínez, A.J.** (2019). Study of commercial quality parameters, sugars, phenolics, carotenoids and plastids in different tomato varieties. *Food Chem.* **277**: 480–489.
- Doebley, J.F., Gaut, B.S., and Smith, B.D.** (2006). Review The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell*: 1309–1321.
- Domínguez, M., Dugas, E., Benchouaia, M., Leduque, B., Jiménez-Gómez, J.M., Colot, V., and Quadrana, L.** (2020). The impact of transposable elements on tomato diversity. *Nat. Commun.* **11**.
- Fatland, B.L., Ke, J., Anderson, M.D., Mentzen, W.I., Li, W.C., Allred, C.C., Johnston, J.L., Nikolau, B.J., and Wurtele, E.S.** (2002). Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in arabidopsis. *Plant Physiol.* **130**: 740–756.
- Fatland, B.L., Nikolau, B.J., and Wurtele, E.S.** (2005). Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in

- Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 182–203.
- Folta, K.M. and Klee, H.J.** (2016). Sensory sacrifices when we mass-produce mass produce. *Hortic. Res.* **3**: 16032.
- Fraser, P.D., Pinto, M.E.S., Holloway, D.E., and Bramley, P.M.** (2000). Application of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection to the metabolic profiling of plant isoprenoids. *Plant J.* **24**: 551–558.
- Fray, R.G. and Grierson, D.** (1993). Identification and genetic analysis of normal and mutant phytoene synthase genes of tomato by sequencing, complementation and co-suppression. *Plant Mol. Biol.* **22**: 589–602.
- Gao, L. et al.** (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nat. Genet.* **51**: 1044–1051.
- Hetherington, S.E., Smillie, R.M., and Davies, W.J.** (1998). Photosynthetic activities of vegetative and fruiting tissues of tomato. *J. Exp. Bot.* **49**: 1173–1181.
- Ilahy, R., Tlili, I., Siddiqui, M.W., Hdider, C., and Lenucci, M.S.** (2019). Inside and beyond color: Comparative overview of functional quality of tomato and watermelon fruits. *Front. Plant Sci.* **10**: 769.
- Isaacson, T., Ronen, G., Zamir, D., and Hirschberg, J.** (2002). Cloning of tangerine from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *Plant Cell* **14**: 333–342.
- Ito, H. and Horie, H.** (2009). Proper Solvent Selection for Lycopene Extraction in Tomatoes and Application to a Rapid Determination. *Bull. Natl. Inst. Veg. Tea Sci.* **8**: 165–173.
- Jenkins, J.A.** (1948). The origin of cultivated plants. *Econ. Bot.* **2**: 379–392.
- Kimbara, J. et al.** (2013). Inhibition of *cutin deficient 2* causes defects in cuticle

- function and structure and metabolite changes in tomato fruit. *Plant Cell Physiol.* **54**: 1535–1548.
- Klee, H.J.** (2010). Improving the flavor of fresh fruits : genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytol.* **187**: 44–56.
- Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D., and Tadmor, Y.** (2005). Carotenoid Pigmentation Affects the Volatile Composition of Tomato and Watermelon Fruits, As Revealed by Comparative Genetic Analyses. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3142–3148.
- Li, X., Tieman, D., Liu, Z., Chen, K., and Klee, H.J.** (2020). Identification of a lipase gene with a role in tomato fruit short-chain fatty acid-derived flavor volatiles by genome-wide association. *Plant J.* **104**: 631–644.
- Lichtenthaler, H.K. and Buschmann, C.** (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* **1**: F4.3.1-F4.3.8.
- Lin, T. et al.** (2014). Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nat. Genet.* **46**: 1220–1226.
- Liscombe, D.K. et al.** (2022). A flavin-dependent monooxygenase produces nitrogenous tomato aroma volatiles using cysteine as a nitrogen source. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **119**.
- Liu, D., YANG, L., ZHANG, J. zhe, ZHU, G. tao, LÜ, H. jun, LÜ, Y. qing, WANG, Y. ling, CAO, X., SUN, T. shu, HUANG, S. wen, and WU, Y. yao** (2020). Domestication and breeding changed tomato fruit transcriptome. *J. Integr. Agric.* **19**: 120–132.
- Martina, M., Tikunov, Y., Portis, E., and Bovy, A.G.** (2021). The Genetic Basis of Tomato Aroma. *Genes (Basel).* **12**: 226.

- Moyle, L.C.** (2008). Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (*Solanum* sect. *Lycopersicon*). *Evolution* (N. Y). **62**: 2995–3013.
- Nguyen, C. V, Vrebalov, J.T., Gapper, N.E., Zheng, Y., Zhong, S., Fei, Z., and Giovannoni, J.J.** (2014). Tomato *GOLDEN2-LIKE* Transcription Factors Reveal Molecular Gradients That Function during Fruit Development and Ripening. *Plant Cell* **26**: 585–601.
- Ortiz-Serrano, P. and Gil, J.V.** (2010). Quantitative comparison of free and bound volatiles of two commercial tomato cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 1106–1114.
- Powell, A.L.T. et al.** (2012). Uniform ripening Encodes a Golden 2-like Transcription Factor Regulating Tomato Fruit Chloroplast Development. *Science*. **336**: 1711–1715.
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F.J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J.P., and Lutts, S.** (2019). Tomato Fruit Development and Metabolism. *Front. Plant Sci.* **10**: 1554.
- Rambla, J.L., Tikunov, Y.M., Monforte, A.J., Bovy, A.G., and Granell, A.** (2014). The expanded tomato fruit volatile landscape. *J. Exp. Bot.* **65**: 4613–4623.
- Razifard, H., Ramos, A., Valle, A.L. Della, Bodary, C., Goetz, E., Elizabeth, J., Li, X., Zhang, L., Visa, S., Tieman, D., Knaap, E. Van Der, and Caicedo, A.L.** (2020). Genomic Evidence for Complex Domestication History of the Cultivated Tomato in Latin America. *Mol. Evol.*: 1–15.
- Roohanitaziani, R., de Maagd, R.A., Lammers, M., Molthoff, J., Meijer-Dekens, F., van Kaauwen, M.P.W., Finkers, R., Tikunov, Y., Visser, R.G.F., and Bovy, A.G.** (2020). Exploration of a resequenced tomato core collection for phenotypic and genotypic variation in plant growth and fruit quality traits. *Genes* (Basel).

11: 1278.

- Simkin, A.J., Schwartz, S.H., Auldridge, M., Taylor, M.G., and Klee, H.J.** (2004). The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* **40**: 882–892.
- Tanksley, S.D.** (2004). The Genetic , Developmental , and Molecular Bases of Fruit Size and Shape Variation in Tomato. **16**: 181–189.
- Tieman, D. et al.** (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science* (80-). **355**: 391–394.
- Tieman, D.M., Zeigler, M., Schmelz, E.A., Taylor, M.G., Bliss, P., Kirst, M., and Klee, H.J.** (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *J. Exp. Bot.* **57**: 887–896.
- Tikunov, Y.M., de Vos, R.C.H., Gonzalez Paramas, A.M., Hall, R.D., and Bovy, A.G.** (2010). A Role for Differential Glycoconjugation in the Emission of Phenylpropanoid Volatiles from Tomato Fruit Discovered Using a Metabolic Data Fusion Approach. *Plant Physiol.* **152**: 55–70.
- Vogel, J.T., Tan, B., Mccarty, D.R., and Klee, H.J.** (2008). The Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1 Enzyme Has Broad Substrate Specificity, Cleaving Multiple Carotenoids at Two Different Bond Positions. *J. Biol. Chem.* **283**: 11364–11373.
- Vogel, J.T., Tieman, D.M., Sims, C.A., Odabasi, A.Z., Clark, D.G., and Klee, H.J.** (2010). Carotenoid content impacts flavor acceptability in tomato (*Solanum lycopersicum*). *J. Sci. Food Agric.* **90**: 2233–2240.
- Yoo, H.J., Kim, J., Park, K., and Son, J.E.** (2020). Light-Controlled Fruit Pigmentation and Flavor Volatiles in Tomato and Bell Pepper. *Antioxidants* **9**:

14.

Zhao, H., Zhong, S., Sang, L., Zhang, X., Chen, Z., Wei's, Q., Chen, G., Liu, J., and Yu, Y. (2020). PaACL silencing accelerates flower senescence and changes the proteome to maintain metabolic homeostasis in *Petunia hybrida*. *J. Exp. Bot.* **71**: 4858–4876.

Zhou, X., Carbonetto, P., and Stephens, M. (2013). Polygenic Modeling with Bayesian Sparse Linear Mixed Models. *PLoS Genet.* **9**: e1003264.

Zhou, X. and Stephens, M. (2012). Genome-wide efficient mixed-model analysis for association studies. *Nat. Genet.* **44**: 821–824.

Zhu, G. et al. (2018). Rewiring of the Fruit Metabolome in Tomato Breeding. *Cell* **172**: 249-255.e12.

Zhu, G., Gou, J., Klee, H., and Huang, S. (2019). Next-Gen Approaches to Flavor-Related Metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **70**: 187–205.

三沢典彦 (2015). 植物におけるカロテノイドの生合成とバイオテクノロジー. *生物工程* **93**: 403–406.