

タマネギ加工時の変色機構の解明と  
タマネギ新品種の開発

2023年1月

加藤 雅博

タマネギ加工時の変色機構の解明と  
タマネギ新品種の開発

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

生命産業科学学位プログラム

博士（生物工学）学位論文

加藤 雅博

## 略語一覽

LF;	Lachrymatory Factor
PRENCISO;	<i>E</i> -(+)- <i>S</i> -(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide
alliinase;	EC 4.4.1.4, syn. cysteine sulfoxide lyase
LFS;	Lachrymatory Factor Synthase
CDs;	Colour Developers
PPs;	Pigment Precursors
NOC;	Naturally Occurring Carbonyl
PP-Val;	2-(3,4-dimethylpyrrolyl)-3-methylbutanoic acid
TFA;	Trifluoroacetic Acid
HPLC;	High Performance Liquid Chromatography
PDA;	Photo Diode Array
LC-MS;	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ;	Dimethyl sulfoxide 重水素標識体
NMR;	Nuclear Magnetic Resonance
FT-IR;	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
CC $\alpha$ ;	Colorless Compound $\alpha$
CC $\beta$	Colorless Compound $\beta$
ELISA;	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR;	Polymerase Chain Reaction
mRNA;	Messenger RNA

# 目次

本論文の要約	1
第1章 緒言	6
第2章 既往の研究	12
2-1 食品ロスの現状	12
2-2 タマネギの変色現象	13
2-3 タマネギの育種と育種技術	16
2-4 総括	19
第3章 タマネギ加工時の変色現象（ピンキング反応）の解明	23
3-1 序	23
3-2 CepthiolanesとL-バリンからの色素前駆体（PP）形成の検討	24
3-3 PPとホルムアルデヒドを含むモデル反応系の経時的な解析	30
3-4 Colorless Compound $\alpha$ の単離と同定	33
3-5 Colorless Compound $\beta$ 、Pink Pigment $\alpha$ 、Pink Pigment $\beta$ の化学構造の 推定	41
3-6 反応機構のまとめと変色機構の抑制方法	52
3-7 第3章の結論	55

第4章 Alliinase抑制タマネギの開発	56
4-1 序	56
4-2 重イオンビームの最適線量の検討	57
4-3. Alliinase抑制タマネギの作出	61
4-4 Alliinase抑制タマネギの特性解析	68
4-5 Alliinase抑制原因の解析	76
4-6 研究成果の産業有用性	92
4-7 第4章の結論	98
第5章 総括	100
引用文献	103
付記	110
謝辞	112

## 本論文の要約

近年の社会課題の一つとして、持続可能な開発目標（SDGs）がある。食品業界においても、SDGsの実現に向けて、食品ロス低減を目指した研究が進められている。また野菜など生鮮素材から加工品に至るまでコモディティー化が進む食分野において、食の新たな可能性を拓げる事も、食品業界の研究者の使命だと考える。

本研究においては、トマトに次いで世界で第2位の生産量（年間約1億トン）を有するタマネギを研究対象として、以下に取り組んだ。

- 1) 食品ロス低減を目的としたタマネギ加工時に予期せず発生する変色現象、特にピンキング現象の解明
- 2) 変色現象の抑制が可能で、且つ食の可能性を拓げることができる新たなタマネギ育種素材の開発

### 1) タマネギのピンキング現象の解明

タマネギのピンキングは、まずPRENCISO (*E*-(+)-*S*-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide) がalliinaseで分解され、Color Developers (CDs) が生成することから始まる。生成したCDsは、アミノ酸と反応し、Pigment Precursors (PPs) を形成する。さらにPPsは、天然由来のカルボニル化合物 (NOC) と反応し、色素化合物が生成する。今回、Cepathiolanesとバリンの反応からPPが誘導されたことから、CepathiolanesはCDsの一つであることが確認された。またPPとNOCであるホルムアルデヒドの反応により、無色透明なColorless Compound  $\alpha$  (CC $\alpha$ )、Colorless Compound  $\beta$  (CC $\beta$ )、そしてピンク色素であるPink Pigment  $\alpha$ 、

Pink Pigment  $\beta$ が生成することが明らかとなった。CC $\alpha$ の構造はNMRにより決定し、他の3つの物質の構造は分子式とMS<sup>n</sup>スペクトル解析から推定した。解析の結果、これらの物質の構造は、いずれも2~3分子のPPがホルムアルデヒドの一部を介して架橋された構造をとることが明らかとなった。

この結果を基に、私は新たな変色現象の反応機構を提案すると共に、変色現象の抑制方法として、反応の起点となるalliinaseの働きを抑制したタマネギを作出するという解決方法を見出した。Alliinase抑制タマネギは、alliinase以降の反応が進まないことから催涙・辛み成分であるLachrymatory Factor (LF) などの化合物が生成しない。そのため、このタマネギは涙の出ない、辛みのないタマネギとなり、変色現象を抑制するだけでなく、食の新たな可能性を広げることにも繋がると考えた。そこで次に、alliinase抑制タマネギの開発に取り組んだ。

## 2) Alliinase抑制タマネギの開発

Alliinase抑制タマネギの作出には、非遺伝子組み換え手法である重イオンビーム照射を用いた。具体的には、タマネギの種子へネオンイオンビームを20 Gyで照射し、変異を導入した。その後、照射した種子を栽培したタマネギ球、選抜した球から自殖採種、栽培にて得たその子孫を対象に、催涙性の官能評価、HPLCを用いたLF生成量の評価、およびELISAによるalliinaseタンパク質量の評価により選抜を行った。この工程を繰り返し、M<sub>3</sub>世代のタマネギ球において、2系統の涙の出ない、辛みのないタマネギの作出に成功した。作出した両系統の特性解析として、M<sub>4</sub>世代のタマネギ各系統20球の官能評価を20名のパネラーで実施した。その結果、いずれの球も催涙性や辛みを示さないことが確認できた。またこれらの球のLF生成量は、通常のタマネギの約7.5分の1未満であった。LF生成量が低い

値を示した理由は、LF生成に最も寄与するalliinaseがゲノム上から欠失したことによりalliinase mRNAの発現量（通常のタマネギの1%以下）、alliinaseタンパク質発現量、そしてalliinase活性が抑制されたためであった。

作出したタマネギの産業応用に関して、alliinase抑制タマネギによる変色現象の抑制効果を検証した。その結果、alliinase抑制タマネギでは変色現象が認められず、このタマネギを用いることでタマネギの変色現象を起因とする廃棄ロスを削減できる可能性が示された。

また作出したタマネギは日本では2015年、アメリカでは2020年より一般販売が開始され、生産者、販売者、消費者から好評を得ている。特に、喫食場面においては、スイーツにタマネギを使用したり、厚切りでタマネギを生食するなど、タマネギの新しい使用方法を提供することに繋がり、食の可能性の拡大にも寄与している。

さらに作出したタマネギの特性は、細胞質雄性不稔系統との交配により、メンデルの法則に従いその特性が次世代へ遺伝することが確認できた。この結果は、今後、本タマネギを育種素材として活用することで、より有用な形質を持った品種の作出が可能であることを示している。

以上のように本研究は、食品ロス低減や食の新たな可能性の拡大に貢献する実学的研究である。今後、このタマネギが広く世の中に広まり、タマネギの食べ方や習慣を変え、いつの日か、タマネギの最大の特徴が「催涙性や辛みから甘さに置き換わる」ことにも期待したい。



# Abstract of this doctoral thesis

Masahiro Kato

*Doctoral Program in Bioindustrial Science, Degree Programs in Life and Earth Sciences, Graduate School of Science and Technology, University of Tsukuba, Japan*

Sustainable Development Goals (SDGs) aim to tackle various global challenges in order to attain a sustainable future. To achieve SDGs, several studies in the food industry have focused on reduction of food losses. In addition, the mission of researchers in the food industry is to expand on new possibilities of food, since foods including raw ingredient such as vegetables, to processed foods are becoming increasingly commoditized.

In this study, I focused on onion, the second largest crop produced annually after tomato, at 100 million tons and conducted the following studies:

1. Elucidate unexpected discoloration phenomena, especially pinking, that occur during onion processing in order to reduce food loss.
2. Development of new onion breeding material that can suppress the unexpected discoloration phenomenon and expand food possibilities.

## 1. Elucidation of pink discoloration of onion

In “pinking” of onion, PRENCISO (*E*-(+)-*S*-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide) is degraded by alliinase to produce color developers (CDs). CDs react with amino acids to form pigment precursors (PPs), which react with naturally occurring carbonyls (NOCs) to form pigments. Induction of PP from cepathiolanes and L-valine confirmed that cepathiolanes constitute a member of the CDs. Using the PP and formaldehyde as a NOC, two colorless (Colorless Compound  $\alpha$  [CC $\alpha$ ], Colorless Compound  $\beta$  [CC $\beta$ ]) and two pink compounds (Pink pigment  $\alpha$ ,  $\beta$ ) were derived. The structure of CC $\alpha$  was established by NMR and other three compounds were predicted based on their molecular formula and the MS<sup>n</sup> spectral analysis. The structures of these compounds were two or three molecules of PP cross-linked via a part of formaldehyde. With these, a new reaction scheme for the discoloration of onion was proposed. In addition, based on this scheme, development of onion with reduced alliinase activity was undertaken with the aim of suppressing the discoloration of onion. Onions with reduced alliinase activity do not produce lachrymatory factor (LF) and other compounds because the reaction after alliinase does not proceed. I thought that this onion can not only suppress the discoloration phenomenon but also expand new possibilities of food.

## 2. Development of alliinase suppressed onion

I succeeded in producing two lines of alliinase suppressed onions non-transgenically by irradiating seeds with neon-ion at 20 Gy. The bulbs obtained from the irradiated seeds and their offspring bulbs produced by selfing were screened by sensory evaluation of tear-inducing property, HPLC analysis of LF production level and ELISA analysis of alliinase protein level. After repeated screening and seed production by selfing, two tearless, non-pungent bulbs were identified in the third generation (M<sub>3</sub>). Twenty M<sub>4</sub> bulbs obtained

from each of them showed no tear-inducing property or pungency when evaluated by 20 sensory panelists. The LF production levels in these bulbs were approximately 7.5-fold lower than those of the normal onion. The low LF production levels were due to reduction in alliinase activity, which was a result of deletion of alliinase that mostly contributes to the production of LF in genome; low alliinase mRNA expression (less than 1% of that in the normal onion) and consequent low amounts of the alliinase protein.

The effect of alliinase suppression on preventing the discoloration onion was examined for industrial application. Discoloration was not observed in the alliinase suppressed onion. The result showed that the use of onion with suppressed alliinase activity could fundamentally reduce the waste loss caused by the onion discoloration phenomenon during processing.

Alliinase suppressed onions have been well received by growers, sellers and consumers since its launch in 2015 and 2020 in Japan and U.S., respectively. This is partly because this onion could be used in sweets as well as eaten raw in thick slices which all in turn contributes to the expansion of food possibilities.

Furthermore, it was confirmed that the characteristics of alliinase suppressed onion can be inherited in the next generation following the Mendel's law by crossing with a cytoplasmic male sterile line. This result indicates that this onion developed in this study can be utilized as a breeding material to produce varieties with more useful traits in the future.

As described above, my research is a practical study that contributes to the reduction of food loss and the expansion of new food possibilities. I hope that this developed onion will be widely spread throughout the world, changing the way people eat onions, and that the onion's most important characteristic will change to sweetness instead of tear-inducing property and pungency.

## 第1章 緒言

タマネギ (*Allium cepa* L.) はネギ属に分類され、その起源は中央アジアと言われている。タマネギの歴史は非常に古く、5,000年前の古代エジプト時代から栽培、消費されてきたことが記録されている (Khosa *et al.* 2016)。エジプトのピラミッドの壁に刻まれた碑文によると、エジプト第一王朝時代の労働者には、タマネギとニンニク (*Allium sativum*) が与えられていたことが記録されている (Masamura 2013)。また、タマネギの特徴として、催涙性や舌が焼けるような辛みと特有の香味がある。最古のレシピ本である4,000年前のメソポタミアの粘土板には、タマネギ、ニンニク、ネギ (*Allium fistulosum*) を風味付けに使用していたことが記されている (Bottéro 1985)。この特徴は多くの国の食文化において調理に活用され、現在、タマネギは世界中で栽培されている野菜の一つとなっている。その年間生産量は世界でおおよそ1億トンであり、トマトに次いで第2位の生産量である (<http://www.fao.org/faostat/en/#home> at 2022/08/10)。農林水産省の「野菜の生産・消費動向レポート, 2019」によると、日本国内では年間120万トンが生産され、その半数にあたる約60万トンが家庭で調理、消費され、残りの60万トンが加工・業務用として使用されている。タマネギは、家庭での調理用途だけではなく、業務加工用としての原料用途でも用いられる重要な野菜となっている。

タマネギの特徴である催涙性や辛みを与える催涙成分 (Lachrymatory Factor : 以下 LF) やタマネギ中の様々な物質は、人間が切る、つぶす等の加工や調理を行ったり、虫や鳥が傷つける、かじる等の行為を行うことにより、タマネギの細胞が破壊された時にはじめて生成が開始される。具体的には、タマネギ細胞の破

碎に伴い、タマネギ中に 1% (w/w) 程含まれている含硫アミノ酸である *E*-(+)-*S*-(1-propenyl)-L-cysteine sulfoxide (以下 PRENCISO) が、2 つの酵素 alliinase (EC 4.4.1.4, syn. cysteine sulfoxide lyase) と催涙因子合成酵素 (Lachrymatory Factor Synthase : 以下 LFS) の作用により変換されることを起点としている (Brodnitz *et al.* 1971, Block *et al.* 1979, Randle 1997, Imai *et al.* 2002)。まず PRENCISO が alliinase により 1-propenesulfenic acid へ変換され、その後、LFS の作用により催涙、辛み成分である LF へと変換される (Fig. 1-1)。基質 PRENCISO の約 90%がこの反応により、LF へと変換されると言われている。残りの 10%は、PRENCISO と alliinase の反応によって生じた不安定な 2 分子の 1-propenesulfenic acid が自己縮合を起こし、タマネギ特有の香味に寄与する (*Z,Z*)-di-1-propenyl thiosulfinate、(*Z*)-2,3-dimethyl-1,4-butanedithial *S*-oxide を経由し、5,6-dimethyl-2-oxa-3,7-dithiabicycloheptane となる。その後、直ちにもう 1 分子の 1-propenesulfenic acid と反応し、Cepathiolanes が生成する (Fig. 1-1)。この一連の反応は、高度に精製した基質、酵素を用いたモデル反応系では 30 秒で、タマネギ中でも 3 分 30 秒以内に進むことが報告されており、反応を制御することは難しいと考えられている (Aoyagi *et al.* 2011)。

タマネギの加工時において、前述したタマネギ細胞破碎後に生成する物質が関与する変色現象が、1950 年代より報告されている。タマネギ単独では、ピンク色への変色が、タマネギとニンニクを加熱する際には緑色への変色することが報告されている (Joslyn *et al.* 1956, Joslyn *et al.* 1958, Lukes *et al.* 1959, Joslyn *et al.* 1960)。これら変色現象は、中国の自家製ニンニク製品である "Laba" (Bai *et al.* 2005, Bai *et al.* 2006) では緑変が望ましい工程とされているが、それ以外のほとんどの場合では、品質の低下につながり、製品が廃棄されるため、大きな廃棄

ロスや経済損失を引き起こしている (Shannon *et al.* 1967b)。そのため、色素形成に関わる反応とその制御は、長年にわたり多くの研究が行われているが、未だに反応機構の全容や色素の構造は完全には解明されていない。

また、変色現象の抑制方法としては、タマネギ細胞破碎時の反応を抑える目的で、加熱や pH を下げることで *alliinase* や LFS を失活、またはその活性を抑える方法が考えられる。しかしながら、用途によっては、加熱ができない場合や味覚面への影響から pH を下げるための添加剤が使用できない場合もある。実際、サラダ用途では加熱ができないことや、食品に pH 調整剤を添加した場合、望まない酸味が付与されるといった問題がある。現時点では、食品加工工程において、根本から変色現象を抑制する手段はない。

タマネギを家庭で調理、消費する際の課題は、催涙性や辛みであり、多くの消費者には歓迎されていない。タマネギを刻む時に涙が出ないようにするための対応策として、ゴーグルを装着する、タマネギを冷やす、水の中で刻むなど、種々のコツが提案されている (Block 2009)。このような状況の中、欧米では、催涙性や辛みが弱いタマネギの消費量がタマネギ総消費量の 15~25% を占めるまでになった (Kamoi 2008)。これらの低催涙性、低辛みタマネギは、PRENCISO 含有量が少ないタマネギ品種を硫黄欠乏土壌において、低硫黄肥料で栽培することで生産されている (Randle *et al.* 1994, 1995)。例えば、Vidalia<sup>R</sup> や Supasweet<sup>TM</sup> のようなタマネギが有名である。しかし、これらの低催涙性、低辛みタマネギは、

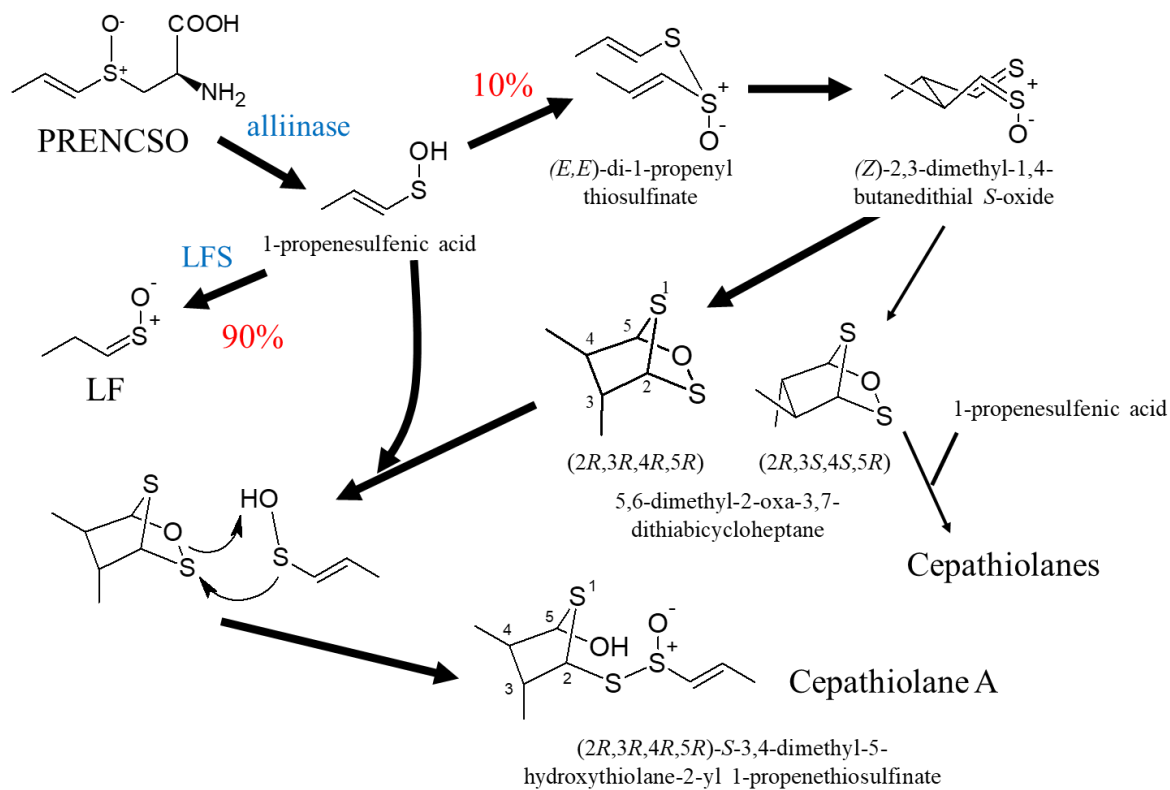
(a) 水分含有量が高く、PRENCISO を高レベルで含有する品種比較すると貯蔵性が悪い、(b) 栽培方法によって催涙性や辛みの値が安定しない、などの欠点が指摘されている (Clemens 2002)。そのため、市場のニーズとして長期貯蔵が可能で、かつ安定して低催涙性、低辛みを示すタマネギの作出が求められている。

タマネギの催涙・辛み成分をはじめ様々な物質の生成は前述の通り、タマネギの細胞破碎後、短時間で進行し、かつ複雑に進んでいく。そのため、個々の物質生成を制御することは困難であり、*alliinase* や *LFS* の発現レベルや *PRENC*SO の含有量を制御することが、より効果的で直接的な方法であると考えられる。

しかしながら、タマネギは二倍体 ( $2n = 2x = 16$ ) でゲノムサイズは約 16 Gb と、栽培されている二倍体植物の中で最も大きい (Van'T Hof 1965, Arumuganathan and Earle 1991, Ricroch *et al.* 2005)。またゲノムサイズが大きいことに加え、ゲノムの 72.4~95%は反復配列であり、その大部分はレトロトランスポゾンから構成されている (Flavell *et al.* 1974, Finkers *et al.* 2021)。遺伝子数は 540,925 個と推定されているが、近年の RNAseq 解析では発現遺伝子数は 47,066 個であるという結果も得られており、多数の偽遺伝子が存在していることが明らかとなっている (Finkers *et al.* 2021)。これらの結果は、タマネギの複雑なゲノム構造や目的遺伝子の制御の困難さを改めて明らかにした一方で、収量、品質、生物的・非生物学的ストレスに対する耐性など農業生産性の向上を目的としたタマネギ育種に加え、味覚面や健康機能など新たな消費者価値の創出を可能にする品種開発に繋がる重要な遺伝情報が明らかとなったとも考えられる。

以上の現状を **Table 1-1** にまとめた。

本研究では、現状を踏まえ、タマネギの加工時に予期せず発生する変色現象の解明、および変色の防止が可能で、かつ食の可能性を拓げることができる新たなタマネギ育種素材の開発を目指し、(1) タマネギ加工時の変色現象 (ピンキング反応) の解明 (第 3 章)、(2) *alliinase* 抑制タマネギの開発 (第 4 章)、について検討した。



**Fig. 1-1. Major breakdown pathway of PRENCISO in onion.**  
 (Based on Aoyagi *et al.* 2011 with minor modifications)

**Table 1-1. Overview of onion relevant to this study.**

年	本研究に関連するタマネギの概況
紀元前2700年頃	タマネギは古代エジプト時代から栽培、消費されていた。
紀元前2000年頃	タマネギ、ニンニク、ネギは料理の風味付けに使用されていた。
↓	タマネギ特有の香味は、多くの国の食文化において料理に活用され、世界中で栽培されるようになっていった。
↓	
1800年代	農業形質向上に向けた育種が開始された。
↓	
1950~1960年代	調理、加工工程でタマネギがピンク色へ変色する現象が報告された。タマネギの変色現象は、品質の低下につながり、製品が廃棄されるため、大きな廃棄ロスや経済損失を引き起こしていた。
↓	
1970年代	タマネギの催涙・辛み成分であるLFをはじめ、タマネギ中で生成する様々な物質の研究が開始された。
↓	
1990年代~2010年頃	欧米では、催涙性や辛みが弱いタマネギの消費量がタマネギ総消費量の15~25%を占めるまでになった。
↓	
~2002年	LFは、タマネギ細胞が破壊された際、タマネギ中に1% (w/w) 程含まれるPRENCISOが、2つの酵素alliinaseとLFSの作用により変換されることを起点として生成することや、その生成物が多数報告された。
↓	
~2021年	タマネギは、ゲノムサイズが16 GBと大きく、かつ複雑なためゲノムリソースの開発が遅れていた。2021年にゲノムの大部分が解読され、今後の育種の発展が期待されるようになった。
↓	
~2022年	タマネギの変色現象は長年にわたり多くの研究が行われているが、未だに反応機構の全容や色素の構造は完全には解明されていない。



## 第2章 既往の研究

本章では、本研究の背景となる食品ロスの現状、タマネギの変色現象に関する反応機構や構造解析、およびタマネギの育種に関する既往の研究を概説し、本研究の意義や解決すべき課題を明らかとした。

### 2-1 食品ロスの現状

近年の国際的な社会課題の一つとして、持続可能な開発目標（SDGs：Sustainable Development Goals）がある。その中で著者の所属する食品業界に関連の深い目標の一つとして、目標 12 [持続可能な消費と生産] の「つくる責任、つかう責任」がある。この中では、2030 年までに小売・消費レベルにおける世界全体の一人当たりの食料の廃棄を半減させ、収穫後損失などの生産・サプライチェーンにおける食品ロスを減少させることが求められている。また、国際連合食糧農業機関 (FAO) は、世界では年間約 50 億トンの食品が生産されているが、その 3 分の 1 が廃棄されており、資源の無駄遣いに加え、環境にも大きな悪影響を及ぼす国際的な社会課題であると指摘している。日本における食品ロスについては、令和 2 年度推計値として年間約 522 万トンの食品ロスが発生している（農林水産省 2022）。食品ロスは、事業活動に伴って発生する食品ロス「事業系食品ロス」と各家庭から発生する食品ロス「家庭系食品ロス」に分けられ、それぞれ事業系食品ロスが 53%（275 万トン）、家庭系食品ロスが 47%（247 万トン）となっている。事業系食品ロスの中で最も廃棄量が多いのが、食品製造時の食品ロスであり 22%（121 万トン）となっている（Fig. 2-1）。

このような現状を踏まえ私は、トマトに次いで世界で第 2 位の生産量（年間

約1億トン)を有するタマネギを研究対象として、①食品ロス低減を目的とした、タマネギの加工時に予期せず発生する変色現象の解明、②変色の防止が可能で食の可能性を拡げることができる新たなタマネギ育種素材の開発に取り組むこととした。

## 2-2 タマネギの変色現象

タマネギやニンニクは世界中で栽培され、様々な加工食品に利用されている。タマネギでは、"ピンキング"というピンク色への変色現象が、ニンニクでは、"グリーニング"と呼ばれる予期せぬ変色現象が加工中にしばしば発生する。中国の自家製ニンニク製品である"Laba" (Bai *et al.* 2005, Bai *et al.* 2006) は"グリーニング"が望ましい工程とされているが、ほとんどの場合、変色は製品の品質を下げ、大きな経済損失を引き起こす (Shannon *et al.* 1967b)。そのため、色素形成に関わる反応機構の解明とその制御は、長年多くの研究者により様々な研究が実施されている。

先行研究により、変色現象は下記の3段階から成ることが知られている (Joslyn *et al.* 1958, Shannon *et al.* 1967a, Lukes 1986, Kubec *et al.* 2004, Imai *et al.* 2006b)。

第一段階は*E*-(+)-*S*-(1-propenyl)-*L*-cysteine sulfoxide (PRENCISO) がalliinaseにより分解され、無色でエーテル可溶性なColour Developers (CDs) と呼ばれる物質が生成する。第二段階は、CDsとアミノ酸の反応により、無色でエーテルに不溶性物質であるPigment Precursors (PPs) が生成する。そして第三段階は、PPsと天然由来のカルボニル化合物 (NOC) の反応により色素化合物が生成する。

最近の研究では、CDsは1-propenyl基を有するThiosulfinatesであり、例えば、1-propenyl 1-propene thiosulfinateであると言われている (Kubec *et al.* 2004,

Imai *et al.* 2006b, Kubec *et al.* 2007)。

CDsと反応するアミノ酸に関しては、アスパラギン、グリシン、グルタミン、セリン、バリンを用いた際に色素生成量が多く、一方でシステイン、ヒスチジン、プロリンを用いた場合は色素が生成しないことが報告されている (Imai *et al.* 2006b)。またタマネギの可食部に多く含まれる遊離アミノ酸は、アルギニンとグルタミンが特に多く、次いでアスパラギン、グルタミン酸、バリン、セリンが多い (公益社団法人 日本栄養・食糧学会 2013)。

さらに、Imai *et al.* (2006a) は、CDsとL-バリンまたはL-アラニンの反応により生成する2つのPPsの構造を、それぞれ2-(3,4-dimethylpyrrolyl)-3-methylbutanoic acid (PP-Val)、および 2-(3,4-dimethyl-1H-pyrrolyl) propanoic acid (PP-Ala) と決定した。

Shannon *et al.* (1967a) は、当時、酢を加えたタマネギでピンクングが頻度高く発生していたことから、使われていた純度の低い酢に少量含まれていたホルムアルデヒドがタマネギのピンク色素形成に関与するNOCであると予想した。実際、ホルムアルデヒドを使うと、短時間にピンクングが起きるので、現在でもホルムアルデヒドが研究に使用されている。また、Imai *et al.* (2006a) は変色現象に関与する物質を単離精製、混合したモデル反応系を用いてニンニクのグリーンングではアリシン (*S*-(Prop-2-en-1-yl)prop-2-ene-1-sulfinothioate) がNOCであることを示すと共に、PP-Valとアリシンの反応により生成する色素の構造を (1*E*)-1-(1-((1*S*)-1-carboxy-2-methylpropyl)-3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)-prop-1-enylene-3-(1-((1*S*)-1-carboxy-2-methylpropyl)-3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylidanium) (PUR-1) と決定した。

さらに、Lee *et al.* (2012) は、タマネギ破碎液と粗精製のニンニク由来alliinase

を含んだ混合系から、ピンクから赤色の7種類の色素化合物が生成することを報告している。また各色素化合物は2分子のPPsが  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$  で結合した構造であるとLC-MS解析により推定した。この $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{}$  は粗精製alliinase中に混入していたアリシン由来であると考えられている。Kubec *et al.* (2007) は、化学合成した1-propenyl基を有するThiosulfinateと20種類のアミノ酸の反応により生成する色素を調査し、その組み合わせによりピンク、赤、赤紫に加え、黄色が生成する事を報告している。

Imai *et al.* (2006a, b) の実験で構築された単離精製された関与物質を用いるモデル反応系は、タマネギやニンニクという多種類のアミノ酸をはじめ様々な物質を含む複合系から脱却し変色現象の解析を単純化すると共に、モル吸光係数が大きい色素化合物をはじめ生成する様々な物質を高純度に多量に精製することを可能にした。

Eady *et al.* (2008) は、RNA干渉によりLFSを抑制したタマネギを開発した。この研究では、LFSが抑制されたことにより細胞破碎時にLFが生成せず、代わりにThiosulfinatesが顕著に増加することを、ピンキング反応を指標として示している。また、Aoyagi *et al.* (2011) は、LFSを抑制したタマネギで有意に増加したThiosulfinates を *S*-3,4-dimethyl-5-hydroxyl-thiolane-2-yl 1-propenyl 1-thiosulfinate (Cepathiolanes) として同定している。Cepathiolanesは無色であり、PRENCSOがalliinaseにより分解され生成するエーテルに可溶な1-propenyl基を含有するThiosulfinatesである。

このように、変色現象の反応ステップや反応に関与する物質は部分的に解明されてはいるが、CDsからピンク色素への反応機構や、ピンク色素の構造は未だに完全には解明されていない。本研究では、変色現象のより詳細な解明とその

抑制方法の提案を目的として、2011年に新たに同定されたThiosulfinatesである CepathiolanesがCDsのメンバーであるか否かを明らかにすると共に、PPとホルムアルデヒドの反応により生成する化合物の構造解析を、Imai *et al.* (2006a, b) が開発した単離・精製した関与物質を用いたモデル反応系を用いて検討した。また、解析した反応経路から、変色現象を抑制する方法についても考察した。

### 2-3 タマネギの育種と育種技術

タマネギは中央アジアを起源とし、5,000年以上にわたって赤道直下の国々を含め世界的に広く栽培されてきた野菜である。タマネギの球形成は日長依存の反応であり、日長感応性に応じて短日系品種（11.5～13時間）、中日系品種（13～14時間）、長日系品種（14～15時間）に分類される。短日系品種には、第一章で記述した *Vidalia*<sup>R</sup> など水分含有量が高く催涙性や辛みが弱い一方で、貯蔵性が低いタマネギが含まれる。長日系品種は、短日系品種と比較して水分含有量が低く貯蔵性が高い一方で、催涙性や辛みが強い特性を持つ。

タマネギは、ゲノムサイズが 16 Gb と非常に大きいこと、二年生植物であること、自然界で頻繁に交雑が起きヘテロ接合性の高い種であることから、品種改良が困難な植物であると言われている (McCallum 2007)。実際にタマネギの品種改良は、イネ科などの他の単子葉植物と比較して遅れている (McCallum 2007, Varshney *et al.* 2012)。本格的にタマネギの育種が開始されたのは 19 世紀になってからである。各国がタマネギの収量、品質、生物的・非生物的ストレスに対する耐性等の農業形質を向上させることを目的に、大規模集団から形質で有望な個体や系統を選抜する育種が開始された。その後、20 世紀半ばにタマネギにおいても細胞質雄性不稔性が発見され、F<sub>1</sub> 品種 (F<sub>1</sub> hybrid [雑種第一代]) の開発

が進み、過去 50 年間で生産量は倍増した (Brewster 2008)。現在、長日系タマネギが栽培されている地域では、F<sub>1</sub> 品種が主流となっている。一方、アジア・アフリカの短日系タマネギを栽培する地域では、固定種 (open pollinated variety) が未だに主流である (Currah *et al.* 1990, Brewster 2008)。

一方で、農業形質以外の課題に対する育種の例は非常に少なく、健康機能性の向上を目的としたものに限られる。一例を挙げれば、抗酸化作用が多数報告されているフラボノイド (主にケルセチンや、その誘導体) に注目したものである。Lombard *et al.* (2004) や Okamoto *et al.* (2006) がケルセチン含量の品種間差異を調査し、その後、Okamoto *et al.* (2006) によりケルセチン含有量を増加させたタマネギが開発された。このように品種開発が限定されている要因の一つとして、タマネギのゲノムサイズの大きさとその複雑さにより、ゲノム配列や cDNA 等の遺伝子情報やライブラリー等のゲノムリソースの開発が進んでいなかったことが考えられる。

近年、Expressed Sequence Tag (EST) や PCR を用いた遺伝的連鎖地図などゲノムリソースの開発により、alliinase や LFS といったタマネギの性質を担う重要な遺伝子の染色体上の位置が明らかになった (Shigyo *et al.* 1996, Kuhl *et al.* 2004, Martin *et al.* 2005)。さらに近年では、次世代シーケンサーの開発により、14.9 Gb 分の高品質のタマネギゲノム配列が報告され、今後の研究開発が加速的に進むことが期待されている (Finkers *et al.* 2021)。

Alliinase 遺伝子に関しては、球で発現するタイプと根で発現するタイプの 2 種類の遺伝子が報告されている (Van Damme *et al.* 1992, Clark 1993, Gilpin *et al.* 1995, Lancaster *et al.* 2000, Do *et al.* 2004)。タマネギの球では、根で発現する alliinase は発現していない、もしくは極僅かしか発現していない。球で発現する alliinase

に関しては、複数の遺伝子座にマッピングされ、その内一つは 4 番染色体上に位置し、もう一方は異なる染色体上に位置すること、およびその距離は 6.5 cM と推定されている (King *et al.* 1998, Van Heusden *et al.* 2000, Martin *et al.* 2005, Khrustaleva *et al.* 2012)。

次に、本研究を開始した2006年当時の育種方法を**Table 2-1**に示した。育種方法は、大別して「自然界から目的個体を選抜する方法」、「人為的な変異導入により変異体を作成する方法」に分けられる。まず自然界から選抜する方法には、近縁野生種を含めた野生種や栽培品種から選抜する方法がある。しかしながら、野生種を用いた場合は変異導入率の低さや遺伝資源入手の困難さが、栽培品種を用いた場合は形質の幅の狭さや育種情報の入手の困難さといった課題がある。自然界の遺伝資源から目的個体を獲得できない場合は、人為的な変異導入により変異体を作成する方法がある。変異導入の方法には、化学物質、放射線、および重イオンビームを用いる方法や遺伝組み換え技術の利用が挙げられる。この中で、重イオンビームを用いる方法は、近年、物理学分野で用いられてきた重イオンビーム照射を植物育種へ応用した非遺伝子組み換えの突然変異育種法である。重イオンビームの照射は、その他の変異誘発技術であるアルキル化剤などによる化学物質処理やX線・ガンマー線・中性子線などのエネルギー線照射と異なり、比較的少量で高頻度に変異を誘発できる。そのため、目的外の植物特性に影響を与えることなく様々な表現型が得られることから、高等植物の変異体作出に広く利用されている (Kanaya *et al.* 2008, Tanaka *et al.* 2010, Kazama *et al.* 2011, Kazama *et al.* 2013)。現在までに、バーベナ (Kanaya *et al.* 2008)、トレニア (Miyazaki *et al.* 2008)、イネ (Ishikawa *et al.* 2012, Takano *et al.* 2013) など多様な作物が作出されているが、これまで野菜での成功例は報告されていない。

遺伝子組み換え技術に関しては、目的形質に関わる遺伝子を直接改編できるため、変異導入率は高く、従来の交雑では作出できない個体の作出も可能である。一方で、法規制があり作物品種の実用化が限定されている。

Alliinaseの働きを抑制したタマネギについては、遺伝子組み換えに該当する手法であるRNA干渉を用いてalliinase遺伝子の発現を約10分の1に抑制したタマネギが開発されている (Eady *et al.* 2005)。しかし、遺伝子組換え植物のため、商業的には生産はされていない。

本研究では、重イオンビーム照射を利用し、alliinase遺伝子の機能を抑制することで、上述したタマネギの変色現象を抑制でき、かつ栽培環境、栽培方法によらず安定的に催涙性や辛みがない特性を有し貯蔵も可能な品種の作出を試みた。このalliinase抑制タマネギは、食品ロス低減に加え、食の可能性を拓げることも寄与できると考えられる。

## 2-4 総括

上述の既往の研究を背景に考えると、本博士論文で研究対象としているタマネギの加工時に予期せず発生する変色現象の解明と変色の防止が可能で食の可能性を拓げることができる新たなタマネギ育種素材の開発には、下記1.~4.の研究の遂行が必須である。

1. PRENCISO、alliinase、Cepathiolanes、アミノ酸、NOCを用いたモデル反応系を用いてタマネギのピンキングに関与する物質の同定、およびその反応生成物の単離精製と構造を解析する。
2. 1の結果より、変色防止策を策定する。



3. 重イオンビーム照射による変異導入とスクリーニングにより、alliinase抑制タマネギを作出し、その特性を解析する。
4. 作出したalliinase抑制タマネギのピンキング抑制効果の確認、およびその特性が次世代へ遺伝するのか否かを明らかにすることで、育種素材としての価値を検証する。

令和2年度推計値

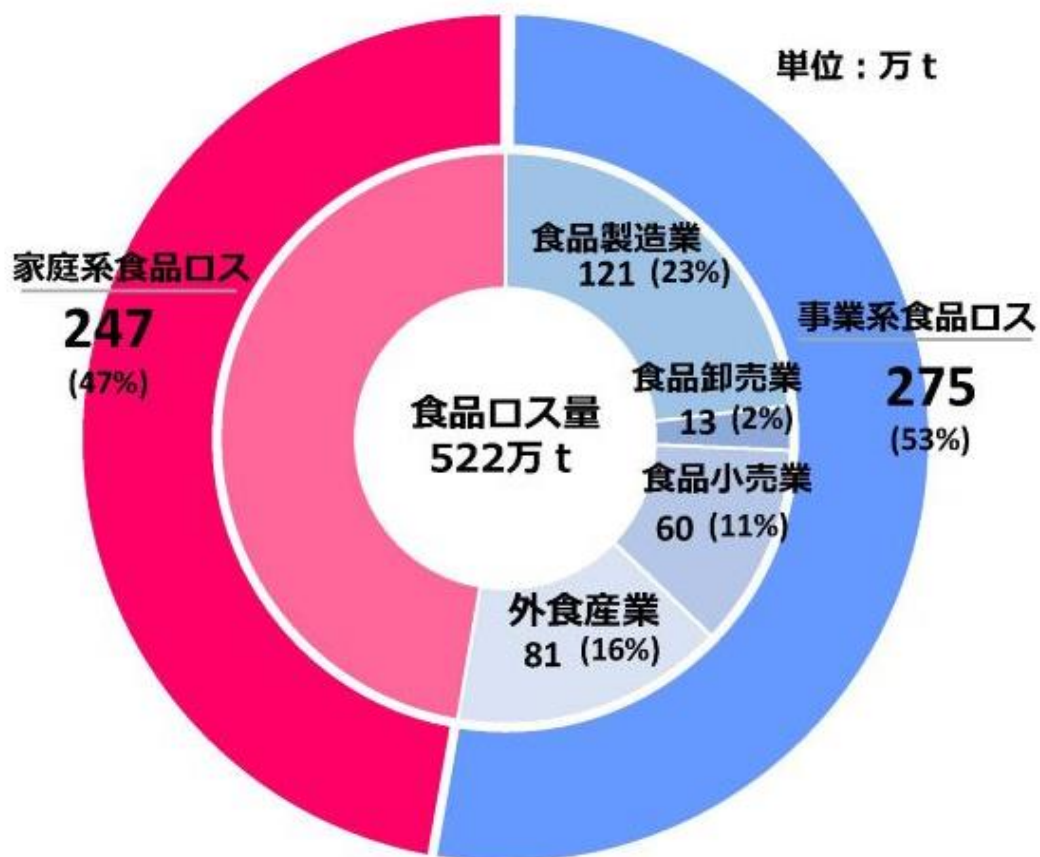


Fig. 2-1. 日本における食品ロスの内訳.

出典：食品ロス及びリサイクルをめぐる情勢（令和4年6月時点版、農林水産省）

**Table 2-1. Summary on the breeding methods.**

方法	自然界から目的個体を選抜		人為的な変異導入による変異体の作出			
	近縁野生種含めた野生種からの選抜	栽培品種からの選抜	化学物質処理による変異導入と選抜	放射線照射による変異導入と選抜	重イオンビーム照射による変異導入と選抜	遺伝子組み換えによる遺伝子改変
原理	自然界で起きた突然変異、交雑、選抜により形質が変化したものからの選抜。	品種改良（例えば、異なる形質を有する品種の交雑・選抜）により作出された有用種からの選抜。	エチルメタンスルホン酸等のアルキル化剤による変異導入と目的個体の選抜。	X線、ガンマー線など放射線による変異導入と目的個体の選抜。	重イオンビーム照射による変異導入と目的個体の選抜。	別の生物から目的とする遺伝子を導入する、又はサイレンシングによる遺伝子発現の抑制により目的個体を作成。
特徴	自然界の環境に依存し、変異蓄積に時間が掛り、且つ目的形質への変異導入率は非常に低い。また遺伝資源の入手が困難。	多くが農業形質向上に着目して改良された品種であり、遺伝資源の幅が狭い。各実施機関の育種情報の入手が困難。	塩基損傷が主であるため、変異導入率が低い。変異規模は小さい。目的外の変異が入るので、他の特性にも影響を与えやすい。	1本鎖DNAの切断、又は塩基損傷のため、変異導入率が低い。変異規模は小～中規模。目的外の変異が入るので、他の特性にも影響を与えやすい。	低線量で2本鎖DNAを切断するため、変異導入率が高く、かつ目的外の植物特性に影響が小さい。変異規模は中～大規模。	目的形質に関わる遺伝子を直接改変可能なため、変異導入率は高い。従来の交雑では作出出来ない個体の作出が可能。但し、法規制があり、作出品種の実用化が限定的。

## 第3章 タマネギ加工時の変色現象(ピンキング反応)の解明

### 3-1. 序

タマネギの最大の特徴は、切断されたり、潰されたりした時、催涙成分 (LF) が発生することである。LFをはじめタマネギが損傷を受ける事によって生成する数多くの特徴的な物質は、タマネギ中に1% (w/w) 程含まれる含硫アミノ酸であるPRENCISOが、タマネギ細胞の破碎に伴いalliinaseとLFSの作用により変換されることを起点としている。

タマネギを用いた加工食品やカットサラダ等の加工工程では、上述した反応で生成したThiosulfinateとタマネギ中に含まれるアミノ酸、カルボニル化合物の反応により、ピンク色への変色現象が、しばしば予期せず発生する。この現象は、1950年代より報告があり、半世紀を越えて食品加工時の品質低下による廃棄ロス、経済損失の観点から問題とされてきた。

この色素形成に関与する成分、反応機構は、1950年代より多くの研究がなされ、以下の3つのステップからなる事が知られている (Shannon *et al.* 1967a, Lukes 1986, Joslyn *et al.* 2000, Imai *et al.* 2006b) 。

1. PRENCISOのalliinaseによる分解 → Color Developers (CDs)
2. CDs + アミノ酸 → Pigment Precursors (PPs)
3. PPs + 天然由来のカルボニル化合物 (NOC) → pigments

CDsは、1-propenyl基を有するThiosulfinatesであり、例えば1-propenyl 1-propene thiosulfinateと報告されている (Kubec *et al.* 2004, Imai *et al.* 2006b, Kubec and Velišek 2007)。

アミノ酸については、Imai *et al.* (2006b) によりアスパラギン、グリシン、グルタミン、セリン、バリンの発色能が高いことが報告されている。またタマネギの可食部に多く含まれる遊離アミノ酸は、アルギニンとグルタミンが特に多く、次いでアスパラギン、グルタミン酸、バリン、セリンが多いと報告されている (公益社団法人 日本栄養・食糧学会 2013)。

PPsについては、Imai *et al.* (2006a) によりCDsとL-バリンまたはL-アラニンの反応により生成する2つのPPsの構造が報告されている。

NOCについては、Shannon *et al.* (1967a) によりホルムアルデヒドがその一つであると報告されている。

しかし、未だにCDsからピンク色素への反応機構やCDsやピンク色素の構造は完全には解明されていない。本研究では、変色現象のより詳細な解明とその抑制方法の提案を目的として、Aoyagi *et al.* (2011) により新たに同定されたThiosulfinateであるCepathiolanesがCDsのメンバーであるか否か、およびPPとホルムアルデヒドの反応により生成する化合物の構造解析を、単離・精製した関与物質を用いたモデル反応系を用いて検討した。また、解析した反応経路から、変色現象を抑制する方法についても考察した。

### 3-2. CepathiolanesとL-バリンからの色素前駆体 (PP) 形成の検討

CepathiolanesがCDsのメンバーであるか否かを、単離精製したCepathiolanesとL-バリンを用いて検証した。L-バリンを選定した理由は、タマネギ中に比較的

多く含まれ、ピンク色に発色し、発色能も高く、かつ $\alpha$ 炭素に結合しているR基に反応性が高い官能基がなく1-メチルエチル基という特徴的な構造を持つためである。

## 【材料および方法】

### 化学物質

本章で使用したすべての化学物質は、特別な記載がない限り和光純薬 (Osaka, Japan) または関東化学 (Tokyo, Japan) から購入した。使用した溶媒はすべて chromatography grade を使用した。

### PRENCISOとalliinaseの調製

実験に使用したタマネギとニンニクは、千葉県四街道市のスーパーマーケット (ナリタヤたかの台店) から購入した。PRENCISOとalliinaseは、それぞれ熱処理したタマネギ球、生のニンニクから、Imai *et al.* (2006 b) に記載の手順に従って調製した。以下に概要を示す。

PRENCISOはアンバーライト™ IR120B陽イオン交換樹脂とC18逆相カラムを用いて、加熱処理後破砕したタマネギ破砕液より精製した。Alliinaseは、ハイドロキシアパタイトカラムとコンカナバリンA-セファロース4Bカラムを用いて新鮮なニンニク片から精製した。精製されたPRENCISOは蒸留水に溶解させ20 mg/mlの濃度に調整した。精製したalliinaseは、10% (v/v) グリセロールと25  $\mu$ Mのピリドキサルリン酸を含む500 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に250 units/mlになるように溶解させた。1分間に1  $\mu$ MのPRENCISOを分解するalliinase活性を1 unitと定義した。

### Cepathiolanesの精製

PRENCISOとalliinaseからなる反応混合物から、立体異性体の混合物としてCepathiolanesを、Aoyagi *et al.* (2011) の手順に従い精製した。以下に概要を記載する。

PRENCISOとalliinaseの反応混合物を室温で30 秒間インキュベートした後、クロロホルムで抽出した。クロロホルムをエバポレーター (NE-IV-29, EYELA, Tokyo, Japan) で除去した後、乾固物をアセトニトリルに再溶解した。その後、LC-9110NEXT recycle-HPLC (Japan Analytical Industry, Tokyo, Japan) で分画した。Cepathiolanesの分取HPLC条件は、カラム：ODS-3カラム (250 x 20 mm, 5  $\mu$ m, GL science, Tokyo, Japan) を2本直列に接続、移動相：0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) 含有70% (v/v) アセトニトリル、流速：5 ml/min、検出波長：UV 254 nm を用いた。55~85分に溶出した画分をCepathiolanesとして回収した。この画分に過剰量のNaClを加え、水層と有機層を分離させた後、有機層を回収した。有機相をエバポレーター (EYELA) で乾固し、8.0 mgの Cepathiolanesを得た。この乾固物を1 ml の0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.6) に溶解した。

### PP-Valの精製

PP-Valは、Imai *et al.* (2006a) が報告した手順に若干の修正を加えて調製、精製した。PRENCISO、alliinase、L-バリンからなるモデル反応混合物を室温で1.5分間インキュベートし、その後、沸騰水中で15分間加熱した。反応生成物をエーテルで抽出しエバポレーター (EYELA) で濃縮後、アセトニトリルに再溶解しLC-9110NEXT recycle-HPLC (Japan Analytical Industry) で精製した。PP-Val精製のHPLC条件は、カラム：ODS-3カラム (250 x 20 mm, 5  $\mu$ m, GL science) と

C8カラム (250 x 20 mm, 5  $\mu$ m, GL science) を直列に接続、移動相 : 0.1% (v/v) TFA含有70% (v/v) アセトニトリル、流速 : 5 ml/min、検出波長 : UV 210 nmを用いた。PP-Valは35.0~37.5分に溶出された。

#### CepathiolanesとL-バリンから反応する生成物のHPLC-PDAによる解析

20  $\mu$ l のCepathiolanes (160  $\mu$ g) と70  $\mu$ lの5% (w/v) のL-バリン、またはネガティブコントロールとしての蒸留水からなる反応混合物を沸騰水中で15分間加熱した後、室温まで自然冷却した。10  $\mu$ lの蒸留水と内部標準として10  $\mu$ g/mlのホルモネチンを含む300  $\mu$ lのメタノールを反応混合物に添加した。次に、この混合物を以下に記すHPLC-PDA解析に供した。

HPLC-PADはAlliance 2695とフォトダイオードアレイ検出器 (Waters, Milford, MA, USA) を用いた。HPLC条件は、カラム : ODS Hypersilカラム (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 、移動相 : 0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル (LC-MSグレード) 、流速 : 0.5 ml/min、カラムオーブン温度 : 30  $^{\circ}$ C、検出波長 : 210~800 nmの範囲を用いた。

#### **【結果および考察】**

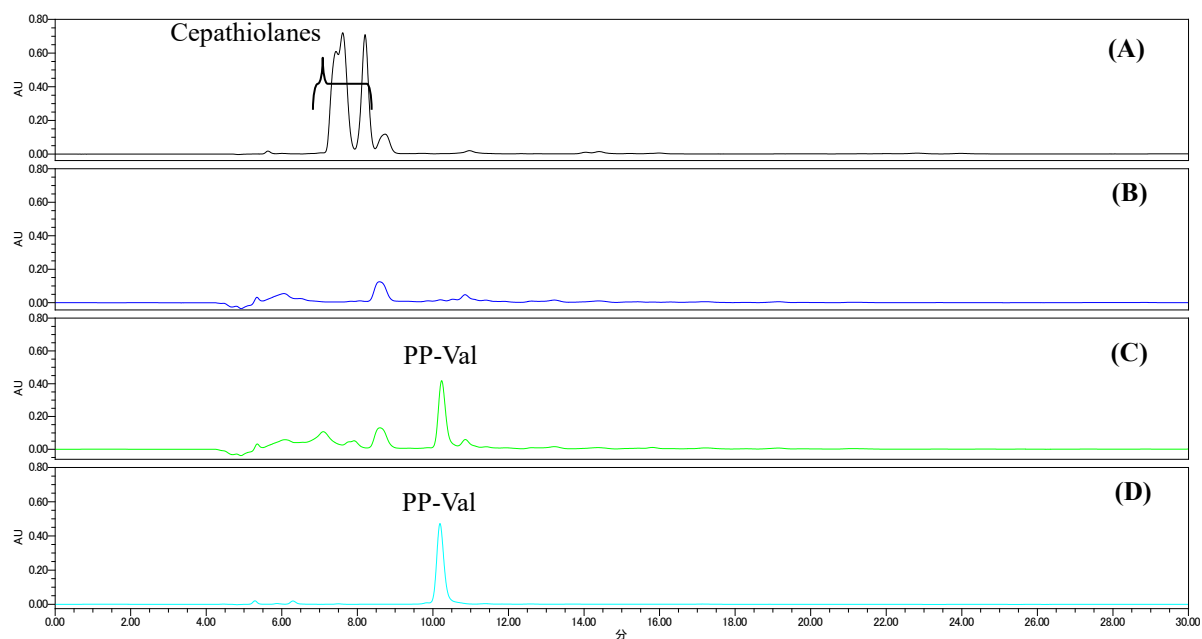
##### CepathiolanesとL-バリンからのPP形成の検討

Cepathiolanesとアミノ酸からPPが形成されるかどうかを調べるために、精製CepathiolanesとL-バリン、またはL-バリンを含まないモデル混合物を加熱した際の生成物をHPLC-PDAで分析した。バリンを含んだモデル混合物のHPLC-PDAクロマトグラムでは、約10.5分にメインピークが検出された (**Fig. 3-1C**)。この検出時間は、Imai *et al.* (2006a) に従って調製した精製PP-Valの検出時間と一致



した (**Fig. 3-1D**)。このピークは、バリンを含まない混合物を分析した場合には検出されなかった (**Fig. 3-1B**)。0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル中における生成物の極大吸収波長は230 nmに見られ、Imai *et al.* (2006a) が報告したPP-Valの極大吸収波長と一致した。これらの結果から私は、CepathiolanesはPRENCISOとalliinaseの反応から得られるCDsのメンバーの一つであると結論付けた。

既報の研究において、Imai *et al.* (2006a, b) は、PRENCISOとalliinaseから成るモデル反応系において1-propenyl 1-propenethiosulfinateが主なCDであると報告した。一方、Aoyagi *et al.* (2011) は、PRENCISOとalliinaseから成るモデル系において、Cepathiolanesが最も生成量が多いことを報告している。Aoyagi *et al.* (2011) の報告と本研究の結果から、PRENCISOとalliinaseから成るモデル反応系においてCepathiolanesが最も主要なCDsであることが考えられた。



**Fig. 3-1. HPLC chromatograms of purified compounds or model reaction products detected at 210 nm.**

HPLC chromatogram of purified cepathiolanes (A), products from the model reaction system without valine (B), products from the model reaction system with valine (C), and purified PP-Val (D).

### 3-3 PPとホルムアルデヒドを含むモデル反応系の経時的な解析

PPとホルムアルデヒドを含んだモデル反応系で生成する物質の確認を行うため、PP-Valとホルムアルデヒドの反応生成物のHPLC-PDA分析を行った。

#### 【材料および方法】

##### PP-Valとホルムアルデヒドの反応生成物のHPLC-PDA分析

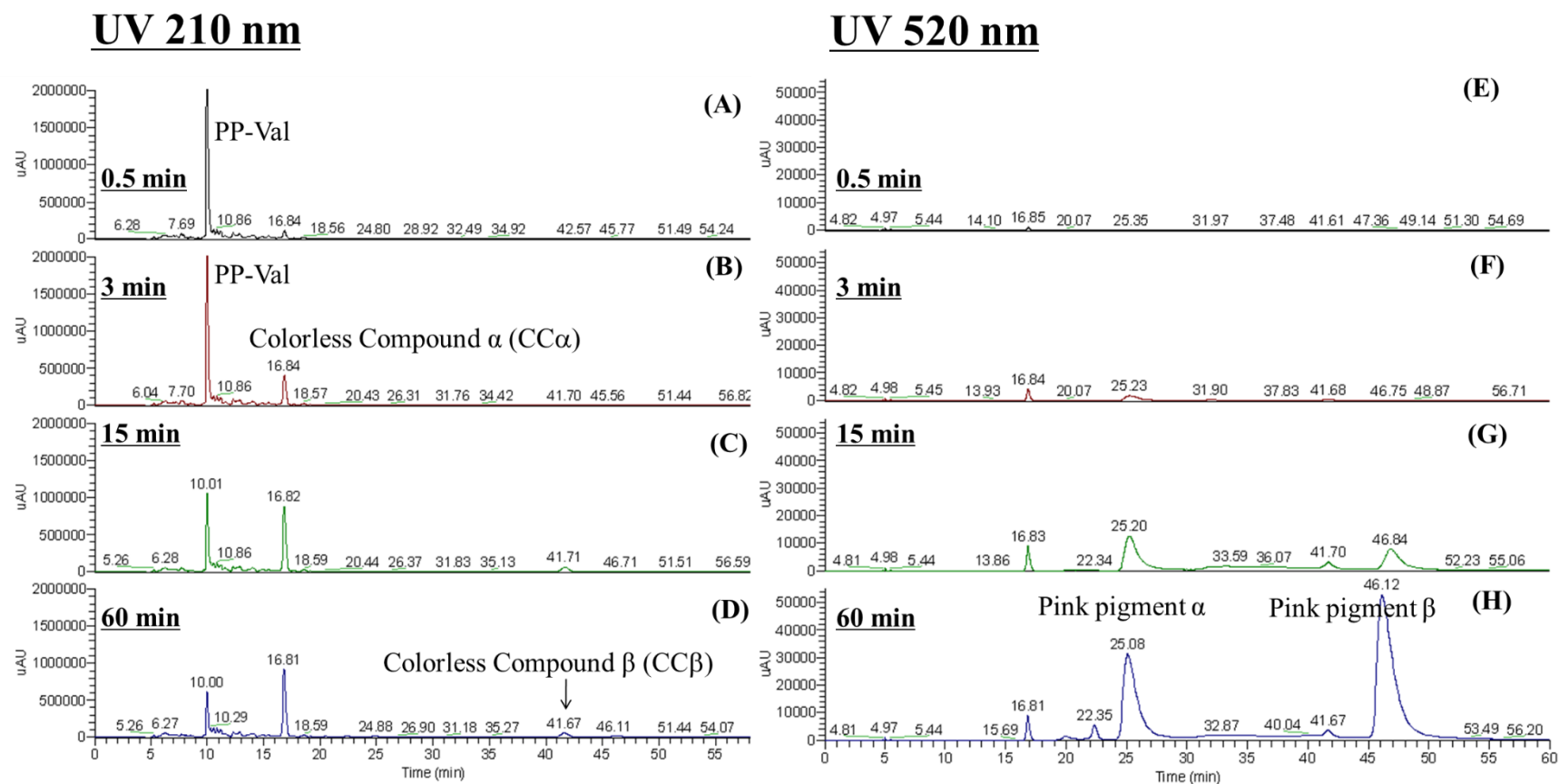
1.6 mlのPRENCISO (32 mg)、3.2 mlのalliinase (800 units)、10.2 mlの5% (w/v) L-バリン (510 µg) から成るモデル反応混合物を室温で1.5分間インキュベートした後、沸騰水中で15分間加熱した。反応生成物をエーテルで抽出した後、エバポレーター (EYELA) で濃縮し、1.25 mlの33% (v/v) メタノールに再溶解した。得られた溶液240 µlに0.3% ホルムアルデヒド15 µlを加え、60 °Cで0.5～60.0分間加熱した。自然冷却により室温に戻した後、300 µlのメタノールを加え、直ちに後述のHPLC-PDA解析に供した。

HPLC-PDAは、UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。LC条件は、カラム：ODS Hypersilカラム (Thermo Fisher Scientific)、移動相：0.05% TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル (LC-MSグレード)、流速：0.5 ml/min、カラムオープン温度：30 °C、検出波長 (PDA)：190～650 nm を用いた。

#### 【結果および考察】

PP-Valとホルムアルデヒドからなる反応生成物をLC-MSを用いて経時的に分析した。時間の経過と共にPP-Valのピークが減少したのに対して、UV 210 nmで検出時間16.8分と41.7分に検出されたピークは反応時間の経過と共に増加した

(Fig. 3-2)。保持時間16.8分と41.7分に検出されたピークをそれぞれColourless Compound  $\alpha$  (CC $\alpha$ ) と  $\beta$  (CC $\beta$ ) と命名した。さらに、UV520 nmで保持時間およそ25.1分と46.5分に検出される2つのピークが反応時間と共に増加した。これらをそれぞれPink Pigment  $\alpha$ ,  $\beta$ と命名した。またこれらのピークはUV 210 nmでは検出されなかった (Fig. 3-2)。



**Fig. 3-2. HPLC chromatograms of model reaction products detected at 210 nm and 520 nm.**

HPLC chromatogram of products from the model reaction system comprising PP-Val and formaldehyde taken at 0.5 min (A), (E), at 3 min (B), (F), at 15 min (C), (G), and at 60 min (D), (H).

### 3-4 Colorless Compound $\alpha$ の単離と同定

3-3で命名した4つの物質の内、まずColourless Compound  $\alpha$  (CC $\alpha$ ) の単離同定を実施した。

#### 【材料および方法】

##### Colourless Compound $\alpha$ の調製

PRENCISO (250 mg) とL-バリン (5 g) を0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.6, 100 ml) に溶解し、精製したalliinase (7,300 units) を加えて室温で1.5分間インキュベートした。反応混合物を沸騰水中で15分間加熱した後、室温まで冷却した。混合物をエーテル (150 ml x 3) で抽出し、エバポレーター (EYELA) を用いて濃縮した。その後、0.1 M 酢酸バッファー (pH 5.6, 60 ml) に再溶解した。再溶解した溶液に15.6 mlの100 ppm ホルムアルデヒドを加え、60 °Cで15分間加熱した。その後、エバポレーター (EYELA) で反応混合物を乾固し、乾固物を7.5 mlアセトニトリルで溶解してLC-9110NEXT recycle-HPLC (Japan Analytical Industry) で分画した。Colourless Compound  $\alpha$ のリサイクルHPLC条件は、PP-Valで使用した条件と同じとした。Colourless Compound  $\alpha$ は53.0~57.0分に溶出した。

##### Colourless Compound $\alpha$ のLC-MS分析

精製したColourless Compound  $\alpha$ のLC-MS および MS<sup>n</sup> 分析は、UltiMate 3000とOrbitrap (Thermo Fisher Scientific) を用いた。LC条件は、カラム : ODS Hypersil カラム (Thermo Fisher Scientific)、移動相 : 0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル (LC-MSグレード)、流速 : 0.5 ml/min、カラムオープン温度 : 30 °C、検出波長 (PDA) : 190~650 nmを用いた。MS解析条件は、解析モード :

ESI in positive mode、スプレー電圧：3.5 kV、キャピラリー温度：300 °C、シーガス：50任意単位、補助ガス：15任意単位に設定した。フルスキャンMS範囲は、分解能60,000で $m/z$  100-800とした。MS<sup>n</sup> 実験では、衝突誘起解離のために50%の相対衝突エネルギーを使用した。データ解析には、Xcalibur 2.11とMS Frontier 7.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

### Colourless Compound $\alpha$ の構造解析

精製したColourless Compound  $\alpha$ の構造解析は、共磁気共鳴分光法 (NMR)、赤外吸収分枝法 (IR分光法) で行った。<sup>1</sup>H NMR および<sup>13</sup>C NMR スペクトルは JEOL ECA-500 (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて精製した化合物 (約10 mg) から取得した。分析溶媒はDMSO-*d*<sub>6</sub>を用い室温で分析を実施した。またDMSOの残留シグナルをリファレンスとした。IRスペクトルは、Perkin-Elmer SYSTEM2000 FT-IR spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて取得した。スキャンパラメータは、スキャン範囲：4000~350 cm<sup>-1</sup>、分解能：4.00 cm<sup>-1</sup>、スキャン数：3とした。UVスペクトルは、UV-3100 PC (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて取得した。分析溶媒はメタノールを用い、スキャン範囲は200~700 nmとした。NMR、FT-IR、およびUVスペクトル分析のその他条件はすべて製造元発行の機器マニュアルの通りとした。

### **【結果および考察】**

高純度PRENCISO、alliinase、L-バリン、ホルムアルデヒドからなるモデル反応系からCC $\alpha$ を単離した。リサイクルHPLCで得られたCC $\alpha$ 画分は無色の溶液であったが、エバポレーターで乾固するとピンク色に変化した。しかし、再溶解した

CC $\alpha$ のHPLC-PDA分析では、99%以上のCC $\alpha$ がそのまま残っていた (data not shown) ため、乾固したCC $\alpha$ をLC-MS、NMR、FT-IR、およびUVスペクトル解析に供した。

CC $\alpha$ の分子式は、高分解能MSスペクトルデータ ( $[M+H]^+$ , calcd. 403.25913, found 403.25827) より、C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>と推定された。一方で、DMSO-*d*<sub>6</sub>中の<sup>13</sup>C NMRスペクトルにおいては、12本の炭素シグナルのみが検出された。この12本の炭素は、ケミカルシフトとDEPTスペクトルによって、CH<sub>3</sub> x 4, CH<sub>2</sub> x 1, -CH- x 2, -CH = x 1, -C = x 3, C = O x 1に分類された。DMSO-*d*<sub>6</sub>中の<sup>1</sup>H NMRスペクトルからは17個のプロトンの存在が確認され、HMQCスペクトルによって<sup>1</sup>Hシグナルと、そのプロトンが直接結合した<sup>13</sup>Cシグナルとの相関を明らかにした。これらの結果から、この化合物はメチレン (C-11) を中心とした対称構造を持つことが示唆された (**Fig. 3-3**)。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYスペクトルでは、2.09 ppm (dq H-8, H-8') のメチンプロトンと、0.78 ppm (d H-9, H-9') と 0.25 ppm (d H-10, H-10') の2つのメチルプロトン、および4.04 ppm (d H-6, H-6') のメチンプロトンとの間にクロスシグナルが確認されたことから、2-methylpropyl unitの存在が示唆された。HMBCスペクトルにおいて、2.09 ppm (H-8, H-8') のメチンプロトンと4.04 ppm (H-6, H-6') のメチンプロトンから、172.5 ppm (C-7, C-7') のカルボニル炭素へのクロスシグナルが認められたことから、このカルボニル炭素はメチン炭素 (C-6, C-6') の隣に位置することが明らかになった。さらに、FT-IR分析において2694 および1722 cm<sup>-1</sup> に赤外吸収が確認されたこと、およびカルボニルの<sup>13</sup>C NMRケミカルシフト (172.5 ppm) からC-7とC-7'は、カルボキシル残基であると推定した (**Fig. 3-3, Unit A**)。さらに、HMBCスペクトルより、1.84 ppm (s 3-Me, 3'-Me) のメチルプロトンは、メチン炭素 (C-2, C-2') と2つの4級炭素 (C-3, C-3') および (C-4, C-4') とクロスシグナルを有していた。



また、1.94 ppm (s 4-Me, 4'-Me) のメチルプロトンは、3つの4級炭素 (C-3, C-3')、(C-4, C-4')、(C-5, C-5') とクロスシグナルを有していた。以上の情報から、部分構造 -C2-C3(-3-Me)-C4(-4-Me)-C5- の存在が確認された。さらに、3.70 ppm (s H-11) のメチレンプロトンからは、2つの4級炭素 (C-4, C-4') および (C-5, C-5') へのクロスシグナルが観察されたため、C-11は4級炭素のC-5とC-5'に結合していることが判明した。以上の結果から部分構造 -C2-C3(-3-Me)-C4(-4-Me)-C5-C11-C5'-C4'(-4'-Me)-C3'(-3'-Me)-C2' が導かれた (Fig. 3-3, Unit B)。

部分構造Unit AとUnit Bのつながりに関しては、4.04 ppmのメチンプロトン (H-6, H-6') から2つの4級炭素シグナル (C-2, C-2') および (C-5, C-5') へクロスシグナルが確認されたことから、C-6は確定していない元素を介してC2およびC5と結合していることが分かった。これまでに確定した元素とMSから推測された分子式C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>を比較すると、確定できていない元素はNである事が判明した。この結果は、CC $\alpha$ がPP-Valを介して生成されることから、妥当な結果であると考えられる。

このことから、CC $\alpha$ の構造は、2-(2-(1-carboxy-2-methylpropyl)-3,4-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methyl-3,4-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)-3-methylbutanoic acidとして確立された。確立した構造は、NOESY相関でも支持されている。メチレンプロトン (H-11) はメチルプロトン (H-4-Me, H-4'-Me) およびメチンプロトン (H-6, H-6') とのクロスシグナルが、メチレンプロトン (3-Me, 3'-Me) はメチルプロトン (H-4-Me, H-4'-Me) とのクロスシグナルがそれぞれ確認された。

CC $\alpha$ の極大吸収波長は、中性や酸性では235 nm、塩基性では228 nmであった (Table 3-1)。塩基性で極大吸収波長が短波長へシフトした理由は、CC $\alpha$ のバリン由来のカルボキシ基やアミノ基の電荷状態が変化したことが影響している可

能性が考えられる。解析したCC $\alpha$ の構造と極大吸収波長の結果から、CC $\alpha$ は無色な物質であることが明らかとなった。

CC $\alpha$ の物理化学的特性、 $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMRスペクトルデータ、および確立した構造を、**Table 3-1**, **Table 3-2** および **Fig. 3-3**にまとめた。

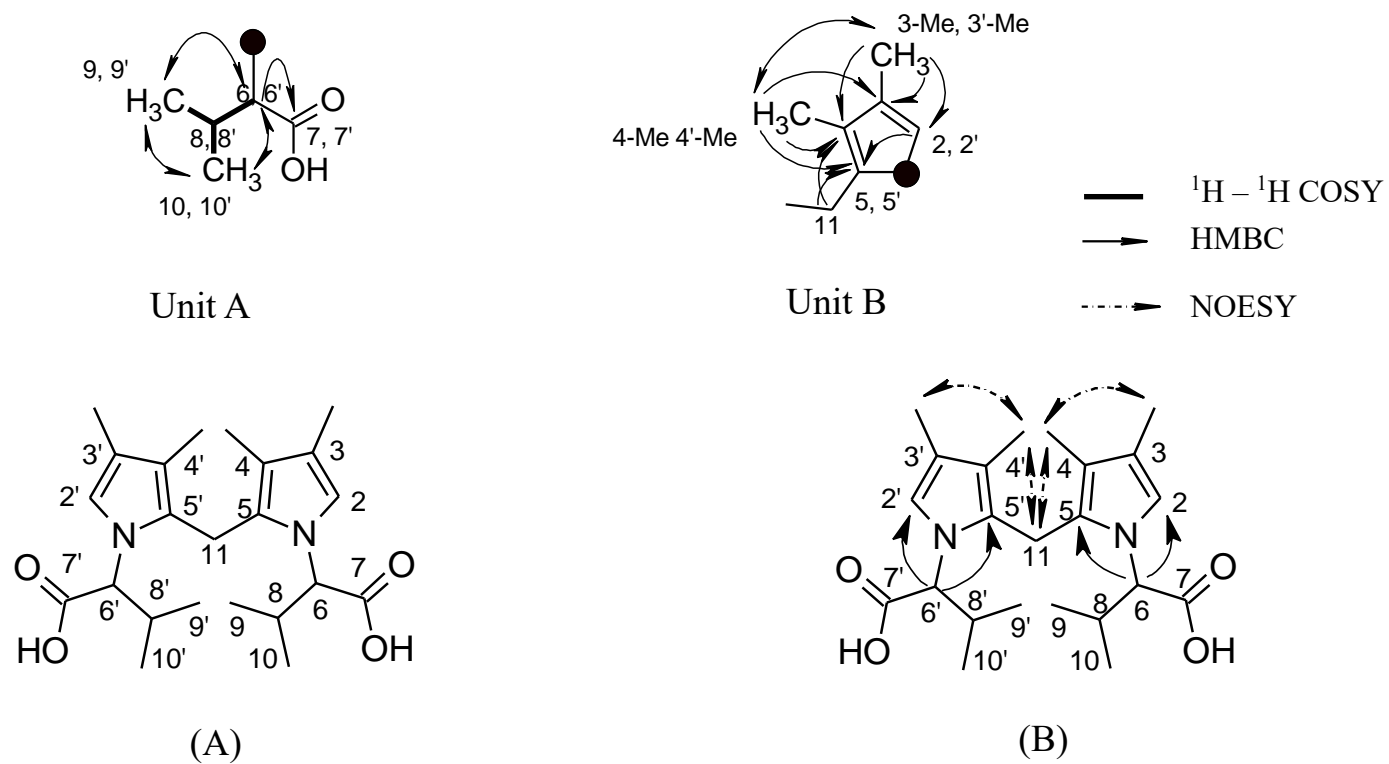


Fig. 3-3. Structure of Ccα (A), COSY, HMBC and NOE analyses of Unit A, Unit B and Ccα (B).

**Table 3-1. Physicochemical properties of colourless compound  $\alpha$ .**

Molecular formula	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
Orbitrap ( <i>m/z</i> ) found calculated	403.25827 (M+H) <sup>+</sup> 403.25913
Uv $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH) nm Uv $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH) + HCl nm Uv $\lambda_{\text{max}}$ (MeOH) + NaOH nm	235 (shoulder) 235 (shoulder) 228 (shoulder)
IR (CHCl <sub>3</sub> ) cm <sup>-1</sup>	2694, 1722

**Table 3-2. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR data\* of Colorless Compound in DMSO-*d*<sub>6</sub>.**

atom	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
2	115.3	6.40 (s)
3	117.0	—
3-Me	10.9	1.84 (s)
4	114.3	—
4-Me	10.1	1.93 (s)
5	126.7	—
6	63.6	4.04 (d, 10.3)
7	172.5	—
8	29.3	2.09 (dqq, 10.3, 6.3, 6.3)
9	19.8	0.78 (d, 6.3)
10	18.8	0.25 (d, 6.3)
11	20.4	3.70 (s)
2'	115.3	6.40 (s)
3'	117.0	—
3'-Me	10.9	1.84 (s)
4'	114.3	—
4'-Me	10.1	1.93 (s)
5'	126.7	—
6'	63.6	4.04 (d, 10.3)
7'	172.5	—
8'	29.3	2.09 (dqq, 10.3, 6.3, 6.3)
9'	19.8	0.78 (d, 6.3)
10'	18.8	0.25 (d, 6.3)

\*Chemical shifts are given in ppm and coupling constants in Hz.

### 3-5 Colorless Compound $\beta$ 、Pink Pigment $\alpha$ 、Pink Pigment $\beta$ の化学構造の推定

CC $\beta$ 、Pink Pigment  $\alpha$ 、Pink Pigment  $\beta$ は生成量が少なかったため、LC-MS および MS<sup>n</sup> 分析により構造を推定した。

#### 【材料および方法】

##### CC $\beta$ 、Pink Pigment $\alpha$ 、Pink Pigment $\beta$ のLC-MS分析

1.6 mlのPRENCISO (32 mg)、3.2 mlのalliinase (800 units)、10.2 mlの5% (w/v) L-バリン (510  $\mu$ g) から成るモデル反応混合物を室温で1.5分間インキュベートした後、沸騰水中で15分間加熱した。反応生成物をエーテルで抽出、エバポレーターで濃縮し、1.25 mlの33% (v/v) メタノールに再溶解した。得られた溶液240  $\mu$ l に0.3% ホルムアルデヒド15  $\mu$ lを加え、60 °Cで0.5~60.0分間加熱した。自然冷却により室温に戻した後、300  $\mu$ lのメタノールを加え、直ちに後述のHPLC-PDAおよびLC-MSに解析に供した。

LC-MS および MS<sup>n</sup> は、UltiMate 3000とOrbitrap (Thermo Fisher Scientific) を用いた。LC条件は、カラム：ODS Hypersilカラム (Thermo Fisher Scientific)、移動相：0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル (LC-MSグレード)、流速：0.5 ml/min、カラムオープン温度：30 °C、検出波長 (PDA)：190~650 nm を用いた。MS解析条件は、解析モード：ESI in positive mode、スプレー電圧：3.5 kV、キャピラリー温度：300 °C、シースガス：50任意単位、補助ガス：15任意単位に設定した。フルスキャンMS範囲は、分解能60,000でm/z 100-800とした。MS<sup>n</sup> 実験では、衝突誘起解離のために50%の相対衝突エネルギーを使用した。データ解析には、Xcalibur 2.11とMS Frontier 7.0 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

## 【結果および考察】

### CC $\beta$

0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル中でのCC $\beta$ の極大吸収波長は230 nmであった (Fig. 3-4)。高分解能MSスペクトルデータ ([M+H]<sup>+</sup>, calcd 610.38506, found 610.38416) より、CC $\beta$ の分子式はC<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>と決定した。CC $\beta$ のMS<sup>n</sup>解析の結果をFig. 3-5Aに示した。CC $\beta$ のフラグメントパターンはCC $\alpha$ のフラグメントパターンと非常によく似ていた (Fig. 3-5B)。MS<sup>1</sup>において、*m/z* 610のイオンから、ピロール環の窒素原子に結合したバリン由来の側鎖に相当するC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>が消失した*m/z* 508のピークが検出された。CC $\beta$ のMS<sup>2</sup>分析では、*m/z* 610のプリカーサーイオンは、*m/z* 415と208のプロダクトイオンが生じることが確認された。*m/z* 415のピークは、*m/z* 610からPP-Val一分子分であるC<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>が消失した分子量に相当すると考えられた。*m/z* 208のピークは、CC $\alpha$ のMS<sup>2</sup>分析でも検出されており、*m/z* 610のイオンからCC $\alpha$ 一分子分であるC<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>が消失した分子量に相当すると考えられた。さらに、*m/z* 415 のピークのMS<sup>3</sup>分析では、*m/z* 220のフラグメントイオンが生成した。*m/z* 220のピークは、*m/z* 415のイオンからPP-Val一分子分であるC<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>が消失した分子量に相当すると考えられた。極大吸収波長230 nmとMS<sup>n</sup>の解析から、CC $\beta$ はCC $\alpha$ とPP-Valがホルムアルデヒドの一部を介して結合した無色な物質であることが強く示唆された。

### Pink Pigment $\alpha$

0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル中でのPink Pigment  $\alpha$ の極大吸収波長は 510 nmであった (Fig. 3-4)。高分解能MSスペクトルデータ ([M+H]<sup>+</sup>, calcd 415.25913, found 415.25839) より、Pink Pigment  $\alpha$ の分子式はC<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>と決

定した。Pink Pigment  $\alpha$ のMS<sup>n</sup>解析の結果をFig. 3-5Cに示した。プリカーサーイオンである $m/z$  415からは、 $m/z$  313と220のプロダクトイオンが生じた。 $m/z$  313と220のピークは、それぞれ $m/z$  415からC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>（ピロール環の窒素原子に結合したバリン由来の側鎖分）とC<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>（PP-Val一分子分）が消失した分子量と一致する。 $m/z$  313のピークに関してMS<sup>3</sup>分析した結果、 $m/z$  313のピークからC<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>が消失した $m/z$  212のピークが得られた。これら $m/z$  415のピークに関するMS<sup>n</sup>分析の結果から、Pink Pigment  $\alpha$ の構造は、2分子のPP-Valが2分子のホルムアルデヒドを介して結合した物質であることが示唆された。さらに、極大吸収波長と分子式から、架橋部分はビニレン基を含み2つのピロール環と共役二重結合を形成していることが考えられた。

一方、Pink Pigment  $\alpha$ の化学構造については、Kubec *et al.* (2015) がHPLC-DAD-MS/MS解析により、ピロール環を架橋している部分は -CH= でありピロールの側鎖に =CH<sub>2</sub> を持つFig. 3-5C'に示す推定構造を報告している。現状では、NMR解析がされていないため、いずれの構造が正しいかは不明であるが、2分子のPP-Valと2分子のホルムアルデヒドからなる物質であることに違いはないと考えられる。

### Pink Pigment $\beta$

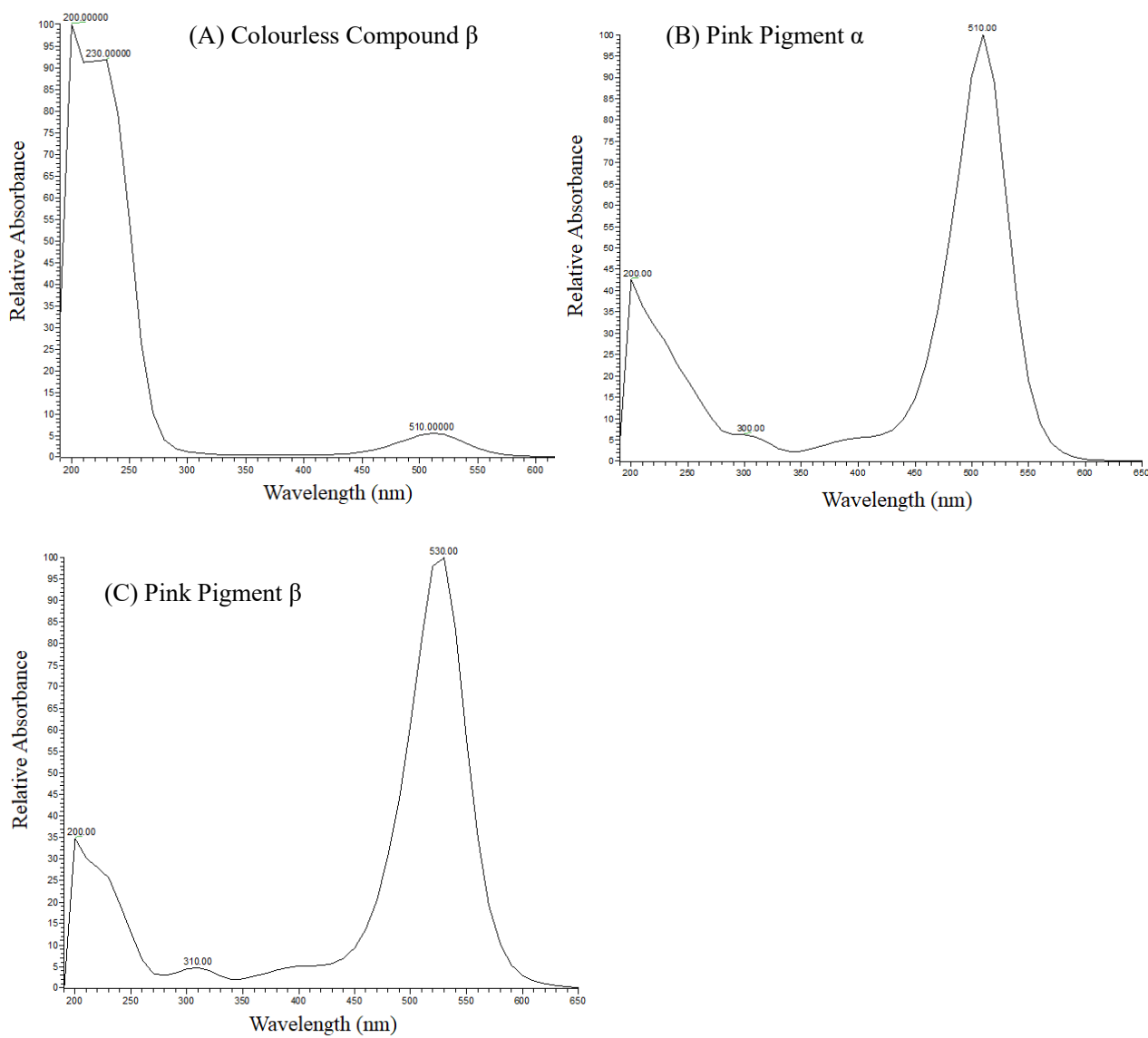
0.05% (v/v) TFAを含む65% (v/v) アセトニトリル中の Pink Pigment  $\beta$ の極大吸収波長は530 nmであった (Fig. 3-4)。高分解能MSスペクトルデータ ([M+H]<sup>+</sup>, calcd 622.38506, found 622.38422) より、Pink Pigment  $\beta$ の分子式はC<sub>36</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>と決定した。Pink Pigment  $\beta$ のMS<sup>n</sup>解析をFig. 3-5Dに示した。プリカーサーイオンである $m/z$  622 から $m/z$  427のプロダクトイオンが生じた。 $m/z$  427のピークは、



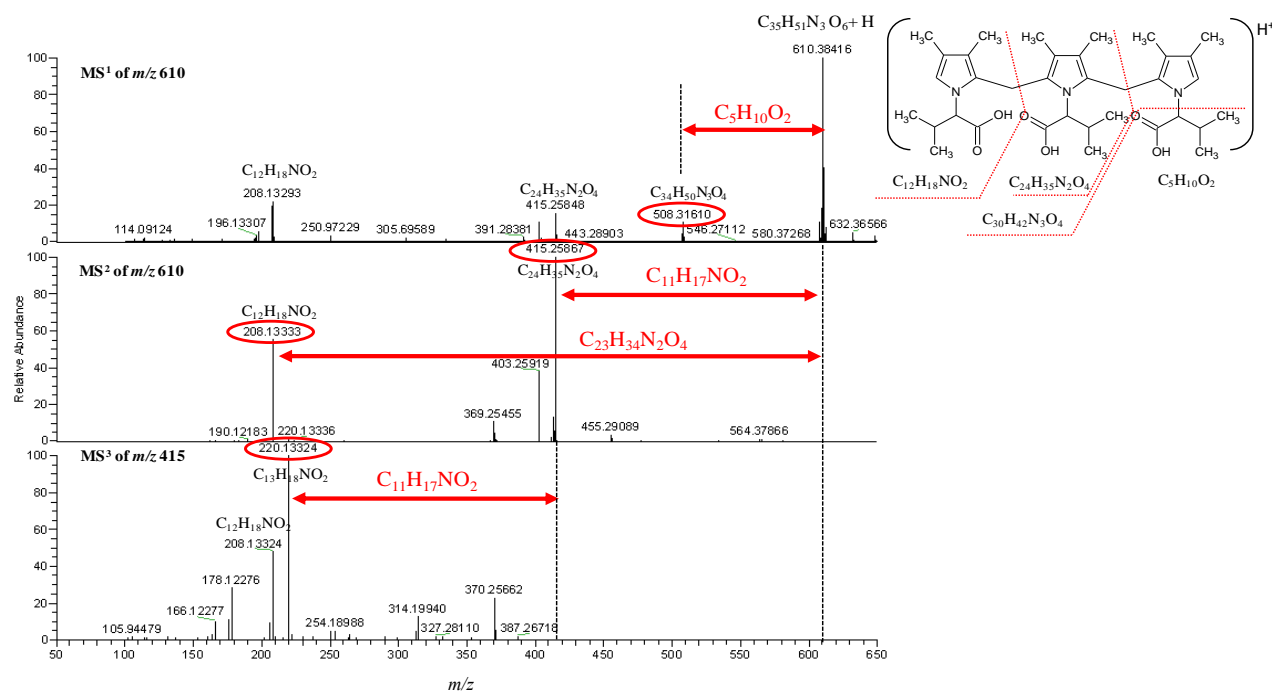
$m/z$  622から $C_{11}H_{17}NO_2$ が消失したことに相当する。 $m/z$  427のピークに関して $MS^3$ 分析した結果、 $m/z$  325と220のピークが生じた。 $m/z$  325のピークは、 $m/z$  427から $C_5H_{10}O_2$ が消失した分子量に相当する。 $m/z$  220のピークは、Pink Pigment  $\alpha$ の $MS^2$ 分析でも検出され、Pink Pigment  $\alpha$ から $C_{11}H_{17}NO_2$ が消失した分子量と一致した。これらの分子式、および $MS^n$ 分析の結果から、Pink Pigment  $\beta$ は3分子のPP-Valが3分子のホルムアルデヒドを介して結合した化合物であることが示唆された。さらに、極大吸収波長の比較から、架橋部分の1つはビニレン基で、もう1つはメチレン基またはメチン基であることが示唆された。

Pink Pigment  $\beta$ は、これまでの報告 (Imai *et al.* 2006b, Dong *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012) やFig. 3-6で示した2量体の色素化合物とは異なり、3量体の色素化合物であることが証明された。本研究の結果は、Imai *et al.* (2006a) が推測した、加熱により重合が進行し、3量体、4量体そしてポリピロール化合物が生成するという予測を支持する結果であるが、これら重合の分子メカニズムは今後の研究課題として残されている。

またCC $\beta$ 、Pink Pigment  $\alpha$ 、Pink Pigment  $\beta$ に関して、 $MS^n$ 解析から予測される化学構造をFig. 3-5に示したが他の構造の可能性もある。これらの化合物の構造を決定するためには、NMR解析の実施に加え、各化合物に相当する天然物由来の化合物との一致をLC-MSで解析することも有効な手段であると考えられる。

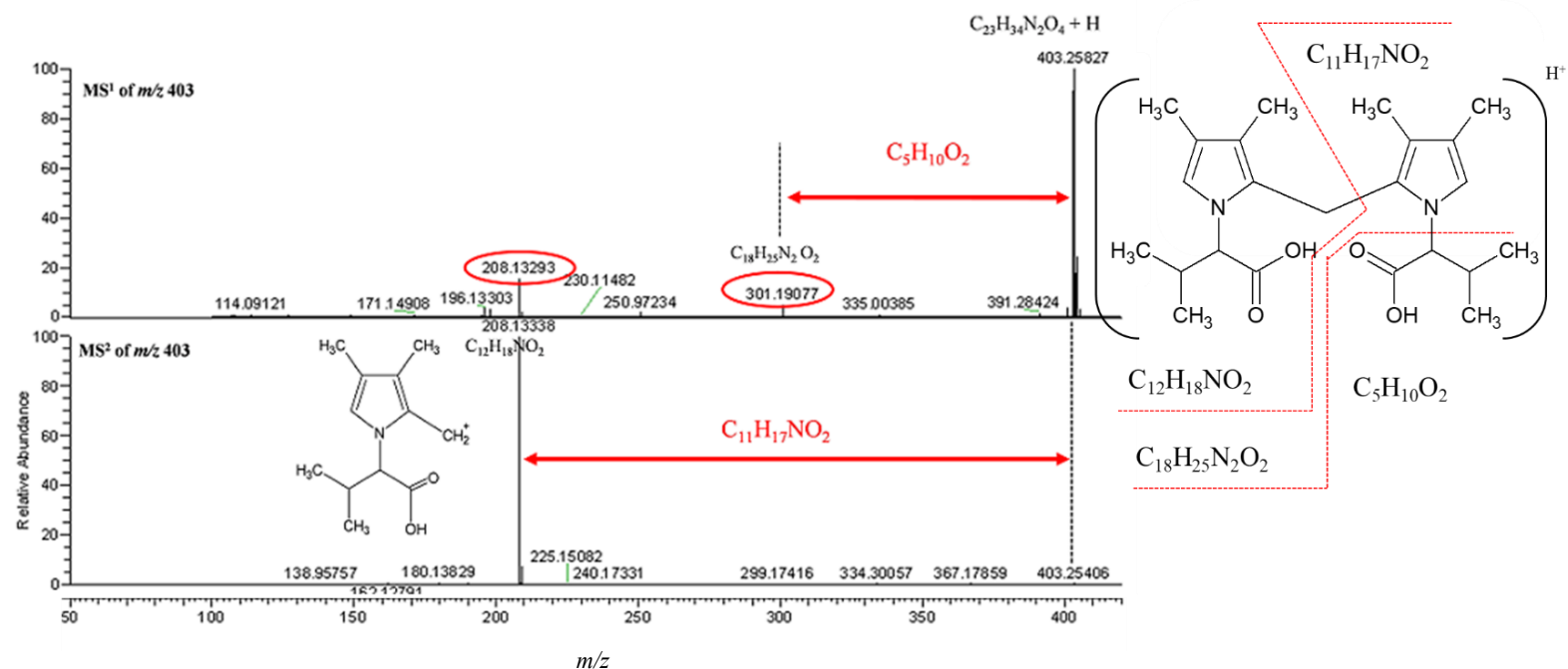


**Fig. 3-4. The maximum absorption of (A) Colourless Compound  $\beta$ , (B) Pink Pigment  $\alpha$  and (C) Pink Pigment  $\beta$  in 65% CH<sub>3</sub>CN containing 0.05% TFA.**



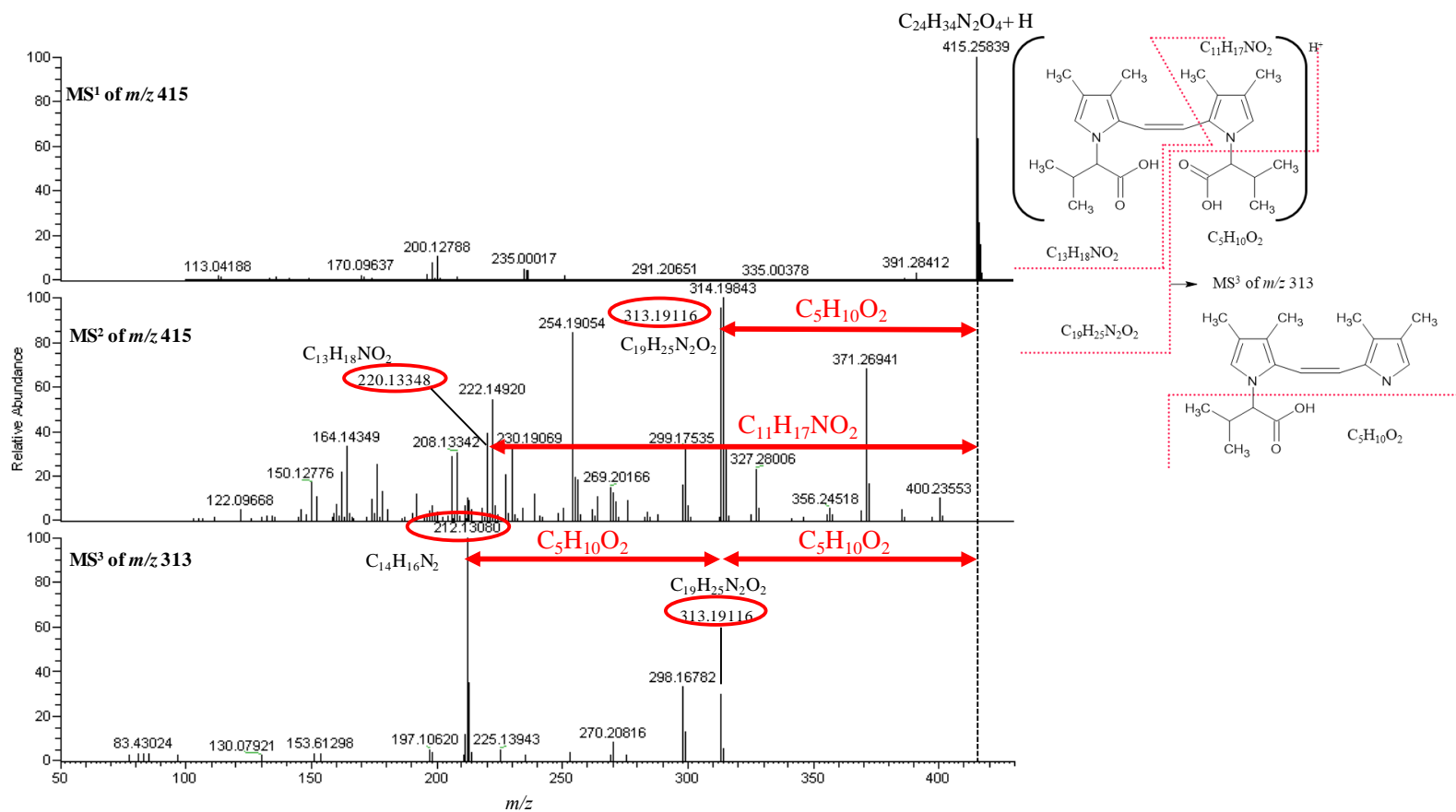
**Fig. 3-5 A. MS<sup>n</sup> fragmentation scheme of CCβ.**

The peak at  $m/z$  508, corresponding to a loss of a  $C_5H_{10}O_2$ , the side chain from valine and attached to the nitrogen atom in the pyrrole ring, from the ion with  $m/z$  610, was detected in MS<sup>1</sup>. The MS<sup>2</sup> analysis of CCβ showed that the mother ion with  $m/z$  610 gave its daughter ions at  $m/z$  415 and 208. The peak at  $m/z$  415 corresponded to a loss of a  $C_{11}H_{17}NO_2$ , one PP-Val, from the ion with  $m/z$  610. The peak at  $m/z$  208, which was also detected in the MS<sup>2</sup> analysis of CCα, corresponded to a loss of a  $C_{23}H_{34}N_2O_4$ , one CCα, from the ion with  $m/z$  610. Furthermore, the MS<sup>3</sup> analysis of the peak at  $m/z$  415 produced a fragment ion at  $m/z$  220. The peak at  $m/z$  220 corresponded to a loss of a  $C_{11}H_{17}NO_2$ , one PP-Val, from the ion with  $m/z$  415. MS<sup>n</sup> analysis strongly suggested that CCβ was a colourless product consisting of a CCα and a PP-Val connected via a formaldehyde moiety.



**Fig. 3-5 B. The MS<sup>n</sup> analysis of CCα.**

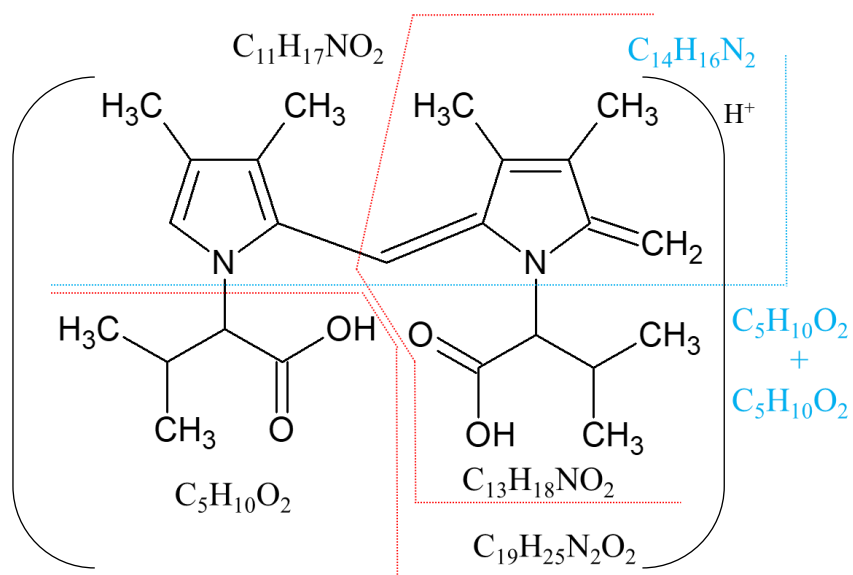
The peaks at  $m/z$  301 detected in MS<sup>1</sup> correspond to a loss of one molecule of C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>, isopropyl group and carboxyl group, from the ion with  $m/z$  403. This loss of C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub> supports presence of the L-valine side chain. In MS<sup>2</sup>, the mother ion  $m/z$  403 [M + H]<sup>+</sup> gave its daughter ion at  $m/z$  208. The peak at  $m/z$  208 corresponds to a loss of a C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>, PP-Val, from the ion with  $m/z$  403. These results strongly suggest that CCα is a product of two PP-Val connected via a formaldehyde moiety.



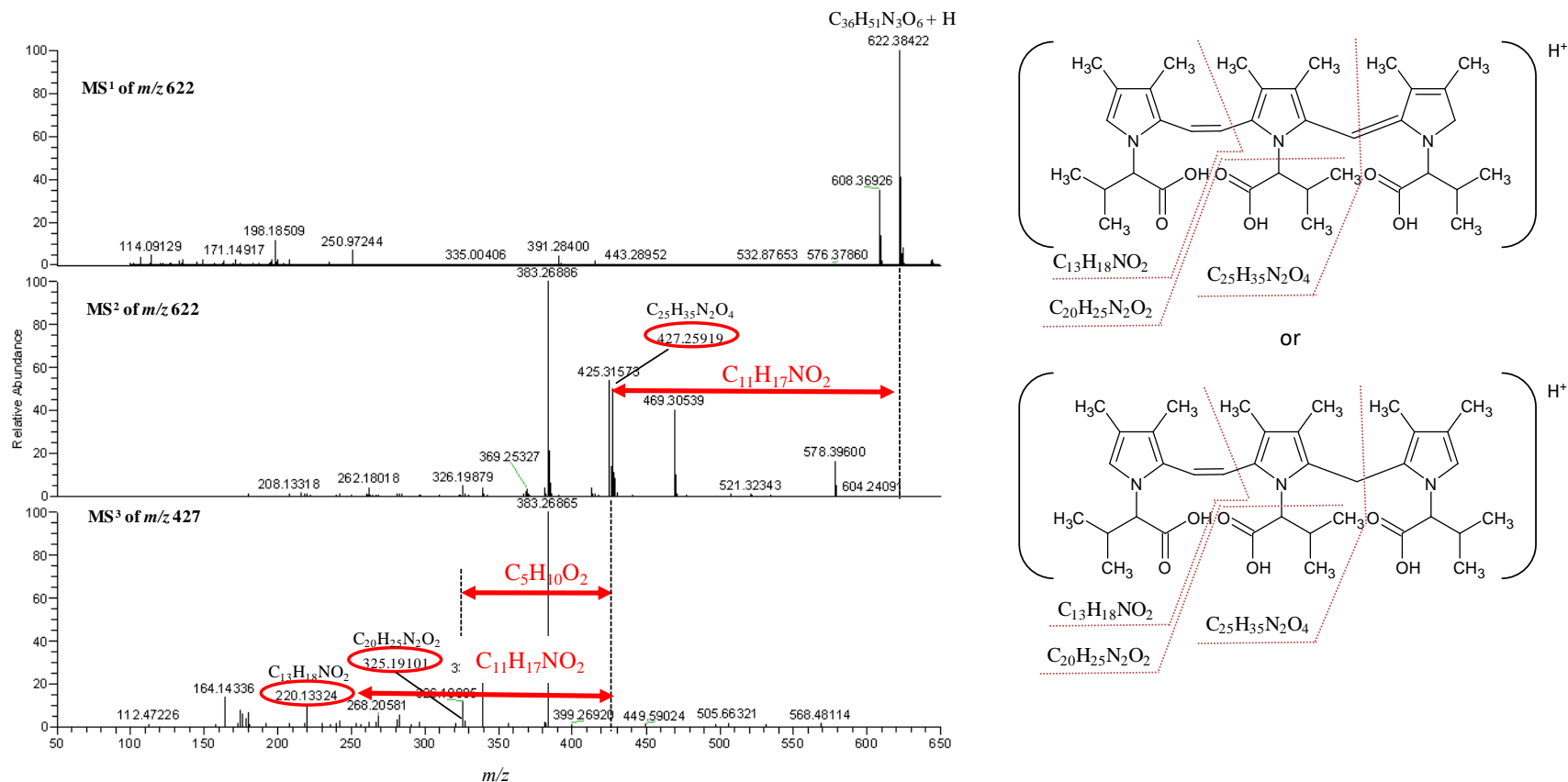
**Fig. 3-5 C. MS<sup>n</sup> fragmentation scheme of Pink Pigment  $\alpha$ .**

The mother ion with  $m/z$  415 gave its daughter ions at  $m/z$  313 and 220. The peaks at  $m/z$  313 and 220 corresponded to a loss of a  $C_5H_{10}O_2$  and a  $C_{11}H_{17}NO_2$  from  $m/z$  415, respectively. The MS<sup>3</sup> analysis of the peak at  $m/z$  313 produced the peak at  $m/z$  212, corresponding to a loss of a  $C_5H_{10}O_2$ . These results of MS<sup>n</sup> analysis on  $m/z$  415 suggested that the structure of Pink Pigment  $\alpha$  would be a product consisting of two PP-Val molecules connected via two molecules of formaldehyde.

$C_{24}H_{35}N_2O_4$   $[M+H]^+$ , calcd 415.25913, found 415.25839

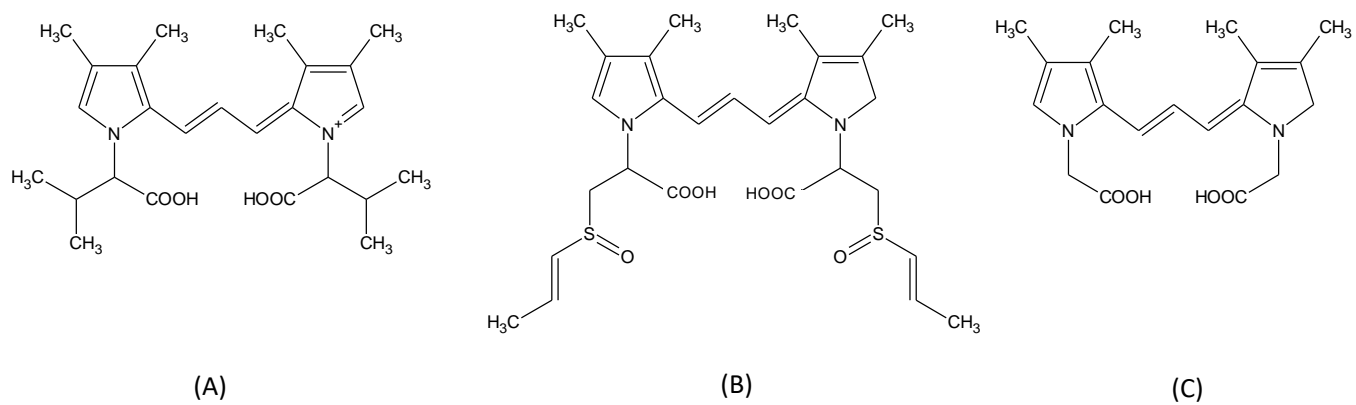


**Fig. 3-5 C'. MS<sup>n</sup> fragmentation scheme of Pink Pigment  $\alpha$ .**



**Fig. 3-5 D. MS<sup>n</sup> fragmentation scheme of Pink Pigment  $\beta$ .**

The mother ion with *m/z* 622 gave its daughter ion at *m/z* 427. The peak at *m/z* 427 corresponded to a loss of a  $C_{11}H_{17}NO_2$  from *m/z* 622. The MS<sup>3</sup> analysis of the peak at *m/z* 427 produced peaks at *m/z* 325 and 220. The peak at *m/z* 325 corresponded to a loss of a  $C_5H_{10}O_2$  from *m/z* 427. The peak at *m/z* 220 was detected in MS<sup>2</sup> analysis of Pink Pigment  $\alpha$ , and corresponded to a loss of a  $C_{11}H_{17}NO_2$  from Pink Pigment  $\alpha$ . These results of the molecular formulae and MS<sup>n</sup> analysis suggested that Pink Pigment  $\beta$  would be a product consisting of three PP-Val molecules connected via three molecules of formaldehyde.



**Fig. 3-6. Chemical structures of pink-red pigments reported by (A) Imai *et al.*, (2006a), (B) Dong *et al.*, (2010), and (C) Lee *et al.*, (2012).**



### 3-6 反応機構のまとめと変色機構の抑制方法

#### 【結果および考察】

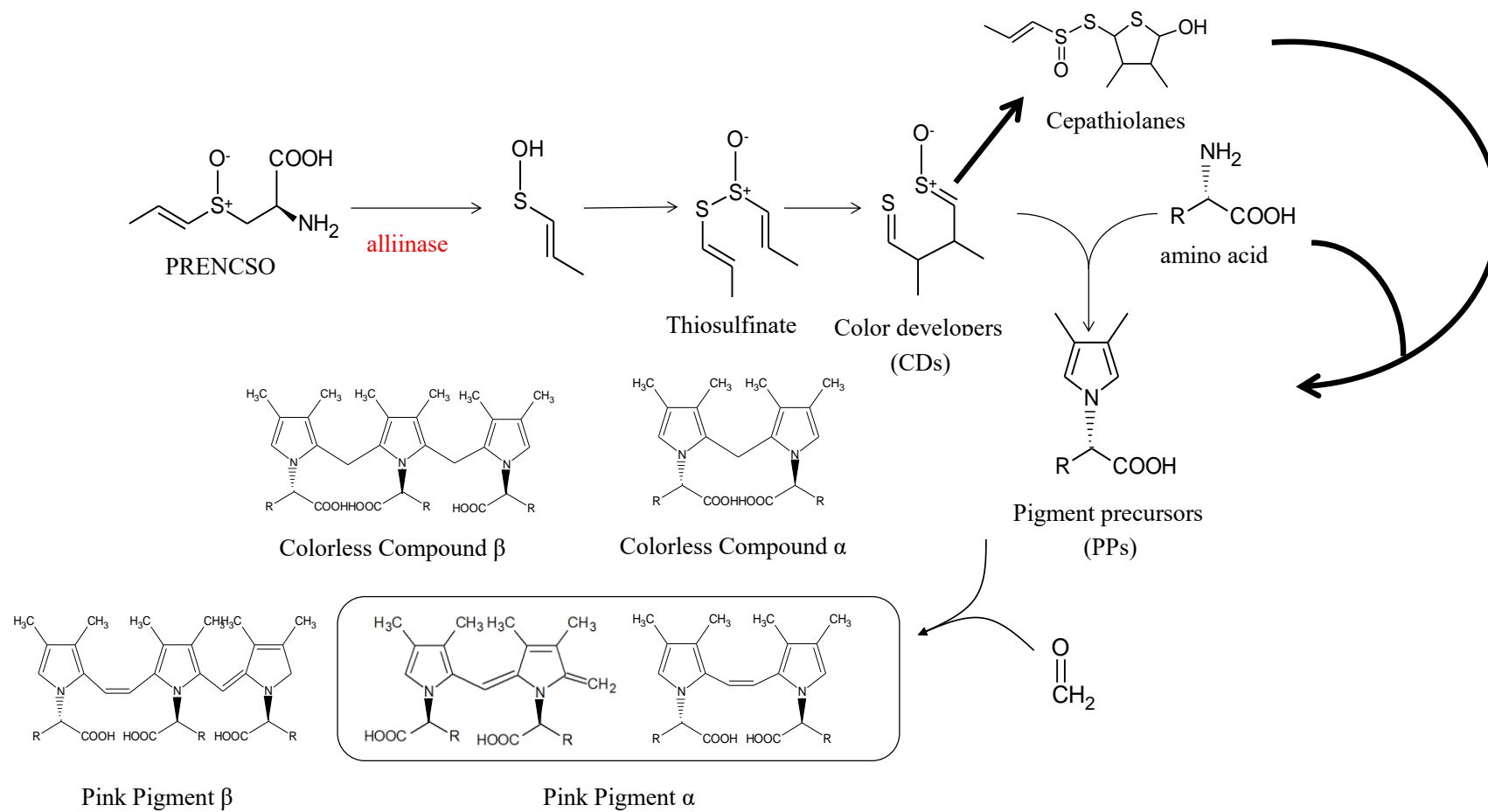
本研究の結果と既報の知見から、**Fig. 3-7**に示すようなピンク色素生成の反応機構を提案した。PRENCISOとalliinaseの反応により生成した1-propenyl 1-propenethiosulfinateは、もう1分子の1-propenesulfenic acidと反応し、2,3-dimethyl butanedithial 1-oxideを介してCepathiolanesへ変化する。次に、Cepathiolanesは様々なアミノ酸と反応し、PPsを形成する。そして最後に、PPがホルムアルデヒドと反応することで、無色の物質とピンク色素を形成する。

このような変色現象の反応機構において、それを抑制する方法を考察した。Cepathiolanesが生成する過程にある1-propenyl 1-propenethiosulfinateから2,3-dimethyl butanedithial 1-oxideへの反応は、シグマトロピー転位であり熱や光により反応が進行する (<https://goldbook.iupac.org/files/pdf/goldbook.pdf>. at 2022/09/14)。実際の加工工程において熱や光を完全に除去することは困難であるため、この反応の制御は難しい。また、Cepathiolanesが生成するまでの時間は、PRENCISOとalliinaseの反応が開始されてから、モデル反応系では30秒間、タマネギ中でも3分30秒間以内に進むことが報告されており、この反応の制御も実用場面では困難である (Aoyagi *et al.*, 2011)。さらに、その後の反応に関与するアミノ酸、NOCに関しても、タマネギ自体にも多種類のアミノ酸や物質が存在するのに加え、食品加工時の多くはその他原料が加わった混合系となるため、より複雑かつ制御が困難なものとなる。

以上のことを踏まえ私は、変色現象の根本的な抑制のためには、変色現象の起点となる反応であるPRENCISOの分解を担うalliinaseの働きを抑制することが重要であると考えた。抑制の方法には、加熱やpHを下げることによる酵素の失活、

またはその活性を抑える方法が考えられる。しかしながら、用途によっては、加熱ができない場合や味覚面への影響からpHを下げるための添加剤を使用できない場合がある。

そこで、私はalliinaseの働きが抑制されたタマネギを作出することが重要であるとの考えに至った。



**Fig. 3-7. A proposed reaction mechanism for the formation of pink pigments in the model reaction system comprising PRENCISO, alliinase, amino acids and formaldehyde.**

### 3-7 第3章の結論

タマネギのピンキング現象において、新たにCepathiolanesがCDsであることを示すと共に、PPを生成する主要物質であることを明らかにした。またPPとホルムアルデヒドを含むモデル反応系から、無色透明なCC $\alpha$ 、CC $\beta$ 、ピンク色素であるPink Pigment  $\alpha$ 、Pink Pigment  $\beta$ が生成することを明らかとし、それぞれの物質の分子式がC<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、C<sub>35</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>、C<sub>24</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>、C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>であると決定した。さらに、それら物質の構造は、2~3分子のPP-Valがホルムアルデヒドを介して架橋された構造をとることを明らかとした。しかしながら、CC $\beta$ 、Pink Pigment  $\alpha$ 、Pink Pigment  $\beta$ の構造を決定するためには、今後、NMR分析が必要である。

これらの知見は、タマネギをはじめとするネギ属の変色現象に加え、同様に基質と酵素により変色が起こる野菜の基礎的な知見としての活用が期待される。

特筆すべき点として、タマネギの変色現象の根本的な抑制方法として、alliinaseの働きが抑制されたタマネギを作出するという解決策を独自に考案した。この解決策で生み出すタマネギは、変色現象を抑制できる可能性があるだけでなく、それ以降の反応が進まないことから、催涙性や辛みがないタマネギとなると考えた。このタマネギは、酵素の働きを抑制するため、栽培環境や栽培方法によらず安定的に催涙性、辛みがない特性を維持する新たなタマネギになる可能性がある。この特性は、水さらし調理不要という簡便さに加え、水さらしによる成分流出を抑え、タマネギ本来の甘みや栄養を余さず摂取できることにも寄与するなど、タマネギの新しい生食場面を提供することに繋がり、食の楽しさを広げることもできるのではないかと考えた。

以上のように、alliinase抑制タマネギは、食品ロス低減に加え、食の可能性を広げることにも寄与できると考えられる。

## 第4章 Alliinase抑制タマネギの開発

### 4-1 序

第3章では、タマネギの変色現象の反応機構を明らかとすると共に、その根本的な抑制方法として、alliinaseの働きが抑制されたタマネギ（以下：alliinase抑制タマネギ）を作出するという解決方法を見出した。Alliinase抑制タマネギは、変色現象を抑制するだけでなく、alliinase以降の反応が進まないことから根本的に催涙性や辛みが生成しないタマネギと成りえる。また育種の出発素材に長日系の貯蔵が可能な品種を用いることで、既存の催涙性や辛みの弱いタマネギの課題である特性の安定性や貯蔵性を改善できる可能性があると考えた。

しかしながら、第2章に記載した通りタマネギは、ゲノムサイズが16 Gbと非常に大きく、かつゲノム構造が複雑であるため、ゲノムリソースの開発が遅れている。Alliinaseに関しても複数の遺伝子が存在し、それらが別々の染色体上に位置するという報告以外には解析が進んでいなかった（King *et al.* 1998, Van Heusden *et al.* 2000, Martin *et al.* 2005, McCallum 2007, Khrustaleva *et al.* 2012, Varshney *et al.* 2012）。

近年、物理学分野で用いられてきた重イオンビーム照射を植物育種へ応用した非遺伝子組み換えの突然変異育種法が開発された。重イオンビームの照射は、比較的低線量で高頻度に変異を誘発することが可能であり、かつ他の植物特性に影響を与えることなく様々な表現型が得られることから、高等植物の変異体作出に広く利用され始めていた。

本章では、タマネギ品種「スーパー北もみじ」（長日系〔日長感応性：約14時間〕、長期貯蔵〔貯蔵期間：6～7ヶ月〕、中～大サイズ〔球重：180～260 g〕、

辛み値 [ピルビン酸生成量：5～10  $\mu\text{mol/g FW}$ ] ) に重イオンビームを照射することで、alliinase抑制タマネギの作出を試みた。また作出したタマネギの特性解析、タマネギ変色現象の抑制効果、そして育種素材として特性が次世代に遺伝するのかを検証した。

## 4-2 重イオンビームの最適線量の検討

### 【材料および方法】

#### 化学物質と材料

4-2～4-5の検討で使用したすべての化学物質は、特別な記載がない限り和光純薬 (Osaka, Japan) または関東化学 (Tokyo, Japan) から購入した。使用した溶媒はすべてchromatography gradeを使用した。タマネギ種子 (品種：スーパー北もみじ) は、(株) 植物育種研究所 (Hokkaido, Japan) から購入した。海外産含め各産地の品種不明の短日系タマネギ、中日系タマネギ、長日系タマネギは、千葉県、または東京都のスーパーマーケット (タリタヤたかの台店、ヨークマート都賀店、大丸東京店、新宿伊勢丹、成城石井 愛宕グリーンヒルズ店) で購入した。実験のコントロールとして、alliinase抑制タマネギと同じ畑で同じ栽培管理で栽培した黄タマネギ (品種：札幌黄) を使用した。細胞質雄性不稔のタマネギは、

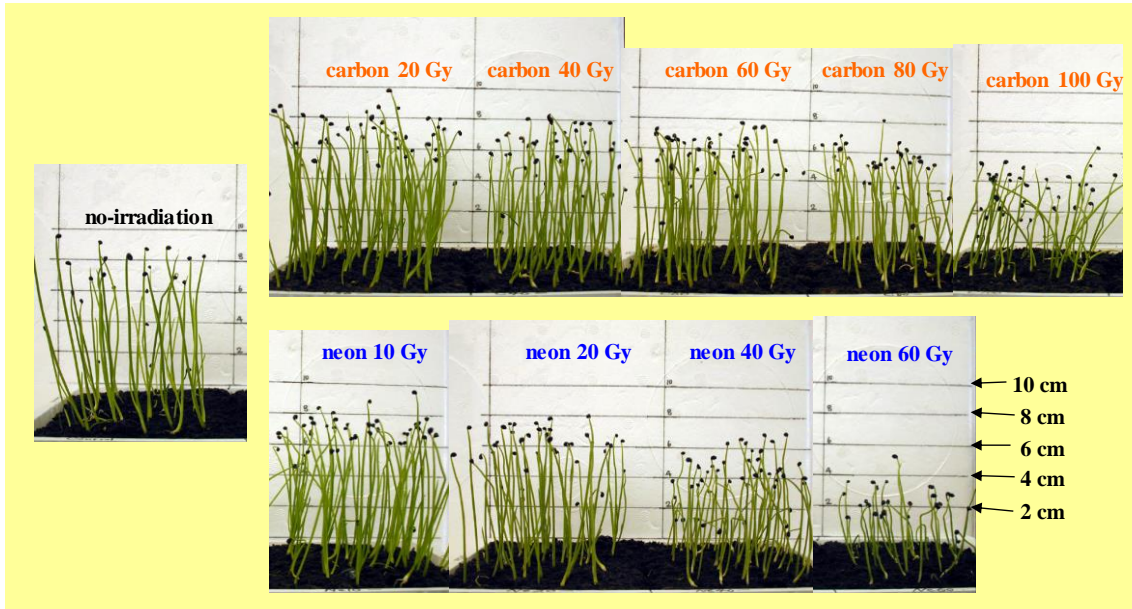
(株) 植物育種研究所で育成した品種を用いた。各実験で用いたalliinaseは、第3章の記載と同様に、ハイドロキシアパタイトカラムとコンカナバリンA-セファロース4Bカラムを用いて新鮮なニンニク片から精製した。精製したalliinaseは、10% (v/v) グリセロールと25  $\mu\text{M}$ のピリドキサルリン酸を含む500 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) に250 units/mlになるように溶解させた。

## 重イオンビームの最適線量の検討

炭素で5試験区（20 Gy、40 Gy、60 Gy、80 Gy、100 Gy）、ネオンで4試験区（10 Gy、20 Gy、40 Gy、60 Gy）を設定し、乾燥状態のタマネギ種子（品種：スーパー北もみじ）約1,500粒に、大気圧下で設定に従い各ビームを照射した（RIKEN RI-beam factory [RIBF], Saitama, Japan）。照射後の各試験区から60粒ずつをゴールドデンピートバンに播種し、15℃で生育させた。その後、1か月後の子葉展開個体の割合と正常生育率（苗丈5 cm以上の苗に占める第二葉展開個体）を算出した。

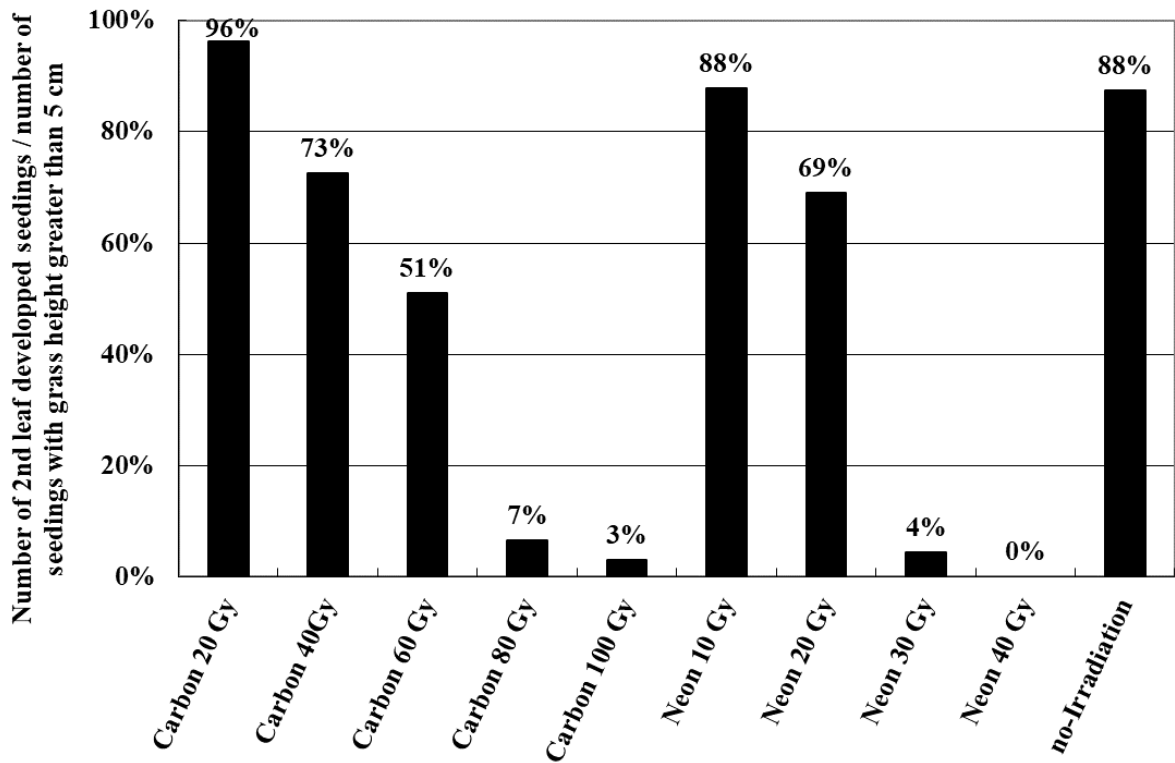
### 【結果および考察】

子葉展開個体の割合は5試験区共に86.7～100%と高い値を示し、重イオンビーム照射はタマネギ種子の子葉展開に影響を与えなかった（data not shown）。照射線量が大きくなるにつれて苗の生育は遅くなった（Fig. 4-1）。正常生育率として、苗丈5 cm以上の苗に占める第二葉展開個体数を求めたところ、照射線量の大きさに反比例していた。特に炭素では60 Gy（Carbon 60 Gy）と80 Gy（Carbon 80 Gy）の間に、ネオンでは20 Gy（Neon 20 Gy）と40 Gy（Neon 40 Gy）の間に大きな差があった（Fig. 4-2）。以上の結果から、炭素では40 Gy～60 Gy、ネオンでは10 Gy～20 Gyが最適照射線量であると判断した。



**Fig. 4-1. Photographs of the plant growth state of each heavy ion beam irradiated seeds (33 days after sowing).**





**Fig. 4-2. Plant growth rate (Number of 2nd leaf developed seedlings / number of seedlings with grass height greater than 5 cm).**

### 4-3. Alliinase抑制タマネギの作出

#### 【材料および方法】

##### Alliinase抑制タマネギのスクリーニング

乾燥状態のタマネギ種子（品種：スーパー北もみじ）約1,500粒（6.08 g）を入れた直径10 cmのプラスチックシャーレに、大気圧下で20 Gyのネオンイオンビームを照射した（RIBF）。イオンのLETは、63 keV/μmに相当した。

以下、照射当代をM<sub>1</sub>、その後の世代更新後の世代をM<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>とした。

M<sub>1</sub>の種子1,450粒を北海道で採用されている標準的な栽培方法（育苗方法、定植時期、栽植密度、肥培管理など）で栽培し、タマネギ球を収穫した。具体的には、3月に448穴のセルトレーに1,450粒の種子を播種し、ビニールハウス内で育苗を行った。その後、5月に露地圃場へ定植し、9月に球を収穫した。M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>タマネギ球の栽培においても、同様の栽培方法で実施した。

収穫したM<sub>1</sub>タマネギ球の保護葉を除去した後、最外層の肥厚葉 約5～10 gをメスで球の縦方向に切り出すように切除し、分析サンプルとした。第1スクリーニングは、催涙成分生成量を基準とした後述の官能評価、およびHPLC分析で実施した。

第1スクリーニングで選抜した球は、翌年4月より北海道で雨よけ採種用網室を用いた標準的な採種方法（定植時期、栽植密度、肥培管理、交配方法 [袋掛けによるタッピング] など）にて自殖させ、M<sub>2</sub>種子を得た。M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>、M<sub>4</sub>種子の採種も、同様の方法で実施した。

第2、第3スクリーニングでは、タマネギ球の球高約1/2～2/3の位置で水平方向に厚さ約1 mmのタマネギ表層部を切り出した。さらに、切り出したタマネギの中心から3～4葉目の貯蔵葉（約400～600 mg）を切り出し、分析サンプルとした

(Fig. 4-3)。また、分析に用いない茎盤を含む下部は、切断面を室温で十分に乾燥させた後、5℃で保存した。第2、第3スクリーニングは、後述のalliinase抗体を用いたEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、およびタマネギ細胞破壊後に残存するPRENCISO量を指標とした分析に基づき、alliinase抑制タマネギを選抜した。

選抜したタマネギ球は、保存していた下部を雨よけ採種用網室で自殖させ、それぞれ種子を得た。

選抜したM<sub>3</sub>タマネギ球から得られたM<sub>4</sub>種子と札幌黄の種子を同じ圃場の同じ区画で栽培し、後述する分析に供するM<sub>4</sub>タマネギ球とコントロールのタマネギ球を得た。

#### 催涙性と辛みの官能評価

20名のパネラーで、保護葉を除いた生タマネギを口腔内で咀嚼した際に生じる催涙性と辛みの有無を評価した。なお、各球の評価の間には、口腔内を水で洗浄し、サンプル間で酵素や催涙成分が影響しないようにした。

#### 催涙成分 (Lachrymatory Factor [LF]) の定量

HPLCを用いて催涙成分 (LF) を測定した。Fig. 4-3に記載の方法に従い、生タマネギ球の組織400 mgを1.5 mLのエッペンドルフチューブ (Eppendorf, Hamburg, Germany) に採取した。12.5 unitsの精製alliinase、またはalliinaseを溶解した500 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) を添加し、マイクロ乳棒で20秒間破碎した。その後、直ちに15,000 rpm、10秒、4℃で遠心分離し、粉碎から1分20秒後に上清1 µl中の催涙分量をHPLC (LC-10AT, Shimazu, Kyoto, Japan) で分析した。

HPLCの分析条件は、カラム：SenshuPak ODS (250 mm×4.6 mm, Senshu Scientific, Tokyo, Japan)、移動相：0.05% TFAを含む30% (v/v) メタノール (LC-MSグレード)、流速：0.6 ml/min、カラムオープン温度: 35 °C、検出波長：UV254 nmを用いた。

#### Alliinaseタンパク発現量解析: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Alliinaseタンパクの検出は、Kamata *et al.* (2011) が報告したSandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) により行った。分析サンプルは、**Fig. 4-3**に記載した方法に従って採取した600 mgのタマネギ組織に等量の蒸留水を加えて破碎した上清を用いた。Alliinaseに対する抗体は、Eurofins Genomics (旧Operon Biotechnology, Tokyo, Japan) により、一般的な催涙性、辛みを有するタマネギから精製したalliinaseタンパク質をラットへ免疫することで調製された。その後、アフィニティカラムを用いて精製した抗alliinase抗体をSandwich ELISAの捕捉抗体として使用した。検出抗体には、Biotin Labeling Kit-NH<sub>2</sub> (Dojindo Mol, Rockville, MD, USA) を用いて、プロトコルに従い作製した抗alliinase抗体をビオチン化したものを用いた。検出にはマイクロプレートリーダーDS (Pharma Biomedical, Osaka, Japan) を使用した。ELISAの定量可能範囲は、精製ニンニクalliinaseタンパク質を標準物質とした場合、0.3~4.8 µg/mlであった。Alliinaseタンパク質の発現量は、Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で定量した総タンパク質に対する比率で示した。総タンパク質測定時の標準物質は、bovine gamma globulin (Sigma, Kanagawa, Japan) を用いた。

## PRENCISO量の定量

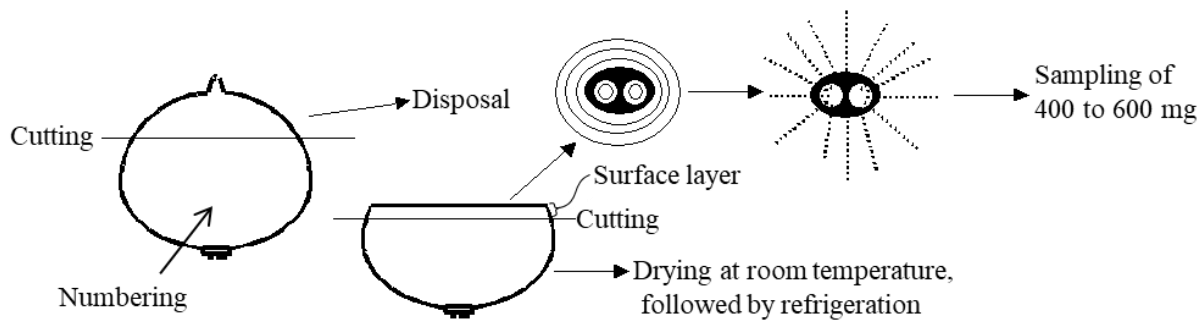
加熱および非加熱（生）のタマネギ球中のPRENCISO量は、Fritsch and Keusgen（2006）の方法に若干の修正を加えて測定した。**Fig. 4-3**に記載した方法に従い、600 mgのタマネギ組織をジルコニアボール（ $\phi = 3$  mm, Nikkato）を3つ入れた2 mlセーフロックチューブ（Eppendorf）に採取した。0.6 mlの蒸留水を加え、60 °Cで1時間加熱（あるいは室温で1時間静置）した。その後、Mixer Mill MM 300（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて30 Hz で6分間破碎した後、15,000 rpm、4 °C、10分間遠心分離し、上清を得た。上清を孔径0.45  $\mu\text{m}$ のメンブレンフィルター（TITAN3 - PTFE, Tomsic, Tokyo, Japan）で濾過し、フォトダイオードアレイ検出器（210～800 nm）を接続したHPLC（Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA）を用いて分析した。

HPLCの分析条件は、カラム：SenshuPak ODS（250 mm $\times$ 4.6 mm、Senshu Scientific）、移動相：0.05%（v/v）TFA水、流速：0.6 mL/min、カラムオーブン温度：35 °Cを用いた。

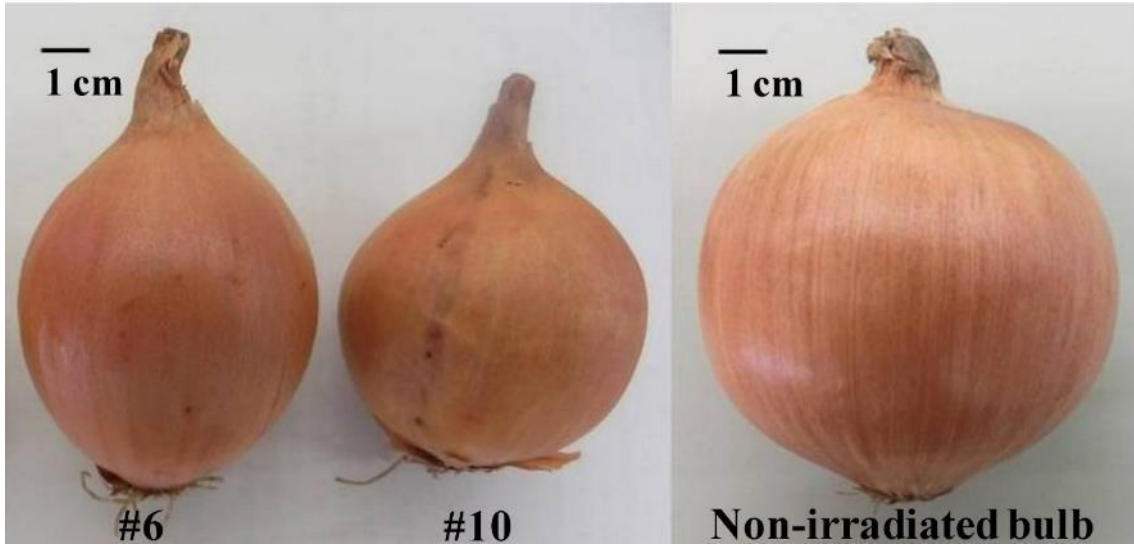
## **【結果と考察】**

日本における普及品種（品種：スーパー北もみじ）の乾燥種子約1,500粒にネオンイオンビームを20 Gyで照射した。1,450粒のM<sub>1</sub>種子を北海道の標準的な栽培方法にて栽培し、457個のM<sub>1</sub>タマネギ球を得た。収穫したM<sub>1</sub>タマネギ球の中から、官能評価、およびHPLC分析により催涙性が弱く、催涙成分生成量が少ない9球を選抜した。選抜した9球から、自殖によるM<sub>2</sub>種子生産を行った。得られたM<sub>2</sub>種子約350粒を播種、栽培し、197個のM<sub>2</sub>タマネギ球を得た。M<sub>2</sub>タマネギ球の選抜は、ELISAでalliinaseタンパク量を測定した。非照射タマネギが示すalliinase

タンパク量の1/10以下を示した18個のM<sub>2</sub>タマネギ球を選抜し、自殖によるM<sub>3</sub>種子生産に用いた。得られた3,250粒のM<sub>3</sub>種子の内、1,078粒を栽培し466球のM<sub>3</sub>タマネギ球を得た。その中から、タマネギ細胞破碎後の残存PRENCISO量 (>3.26 μmol/g FW) と官能評価による辛みの有無で選抜を行い、最終的に2球 (#6, #10) を選抜した。この2個体は、1粒の照射種子より得られた子孫であった。#6と#10の自殖により得られた666粒のM<sub>4</sub>種子から、それぞれ200粒を播種した。#6、#10共に正常に生育し、158球 (#6) と68球 (#10) のM<sub>4</sub>タマネギ球を得た。これらは形態的には一般的な(非照射)タマネギ球(品種:札幌黄)と区別がつかなかった (**Fig. 4-4**)。これらのM<sub>4</sub>タマネギ球を以降の解析に用いた。



**Fig. 4-3. Methods for collecting onion analysis samples.**



**Fig. 4-4.** A photograph of the tearless, non-pungent onion bulbs (#6, #10). The bar shown in the photograph indicates 1 cm.



#### 4-4 alliinase抑制タマネギの特性解析

作出したalliinase抑制タマネギ (#6, #10) の特性解析として、(a) 催涙性と辛みの官能評価、(b) 可溶性固形分 (Brix) 測定、(c) PRENCISO含有量の定量、および催涙性と辛みの化学的分析 (d) 催涙・辛み成分 (LF)、(e) ピルビン酸生成量の定量、を行った。

##### 【材料および方法】

(a) 催涙性と辛みの官能評価、(c) PRENCISO含有量の定量、および  
(d) 催涙・辛み成分 (LF) の定量は、前述の「4-3. alliinase抑制タマネギの作出」に記載した方法を用いた。

##### (b) 可溶性固形分 (Brix) 測定

Digital Refractometer RX-5000 $\alpha$  (Atago, Tokyo, Japan) を用いてSoluble Solidsを測定した。概要は、**Fig. 4-3**に記載の方法に従い、600 mgのタマネギ組織をジルコニアボール ( $\phi = 3$  mm, Nikkato) を3つ入れた2 mlセーフロックチューブ (Eppendorf) に採取した。0.6  $\mu$ lの蒸留水を加え、Mixer Mill MM 300 (Qiagen) を用いて、30 Hz で6 分間破砕した。粉砕後、遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10 min) を行い、上清100  $\mu$ lを用いて測定を行った。

##### (e) ピルビン酸生成量の定量

ピルビン酸生成量は、Anthon and Barrett (2003) の方法に基づいて、マイクロプレートリーダー DS (Pharma Biomedical)を用いて測定した。**Fig. 4-3**に記載した方法に従い、600 mgのタマネギ組織をジルコニアボール ( $\phi = 3$  mm, Nikkato) を

3つ入れた2 mlセーフロックチューブ (Eppendorf) に採取した。0.6 mlの蒸留水を加え、Mixer Mill MM 300 (Qiagen) を用いて、30 Hz で6分間破砕した。粉砕後10分間、室温で静置した後、遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10 min) を行い、上清を分析サンプルとした。分析サンプル20  $\mu$ lを96ウェルプレートに入れ、粉砕から30分間後に蒸留水43  $\mu$ l、0.25 g/l ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) in 1M HCl 66  $\mu$ lを添加し、37 °Cで10分間緩やかに混和しながら反応させた。10分後、1.5M NaOHを66  $\mu$ l添加し反応を停止させた。その後、ピペッティングを3回以上行い、良く混合した後、マイクロプレートリーダーDS (Pharma Biomedical) で515 nmの吸光度を測定した。検量線は0.04~6 mMの濃度のピルビン酸ナトリウム溶液を使用して作成した。

## 【結果および考察】

### (a) 催涙性と辛みの官能評価

M<sub>4</sub>タマネギ球の催涙性、および辛みの程度を調べるため、20名の評価者で20球のM<sub>4</sub>タマネギ球を試食評価した。その結果、全ての評価者がいずれのタマネギ球も催涙性や辛みを示さなかったと回答した (data not shown)。また多くの評価者は、辛みを感じないため、通常は辛みによって感じるできない甘みを感じたと回答した。試食後の口腔内には、タマネギ特有の風味が全く残らなかった。これらの結果から、作出した2系統 (#6, #10) は共に通常のタマネギ球とは大きく異なる性質を有することが明らかとなった。

#### (b) 可溶性固形分 (Brix) 測定

2系統 (#6, #10) のタマネギ、およびコントロールタマネギ球の可溶性固形分濃度は2.8~5.7であり、3群間で統計的な差は認められなかった (**Fig 4-5**)。この結果は、官能評価結果に記した2系統 (#6, #10) のタマネギ球で甘みを感じたという結果と一致している。

#### (c) PRENCISO含有量の定量

LFやピルビン酸の基質であるPRENCISO量をHPLC-PDAで測定した。2系統 (#6, #10) とコントロールの加熱したタマネギ組織中のPRENCISO量は2.5~4.6  $\mu\text{mol/g}$  (**Fig. 4-6**) の間であり、報告されているタマネギが含むPRENCISO量としては通常の範囲内であった (Kitamura *et al.* 1997, Kopsel *et al.* 1999)。

#### (d) 、 (e) 催涙性と辛みの化学的分析

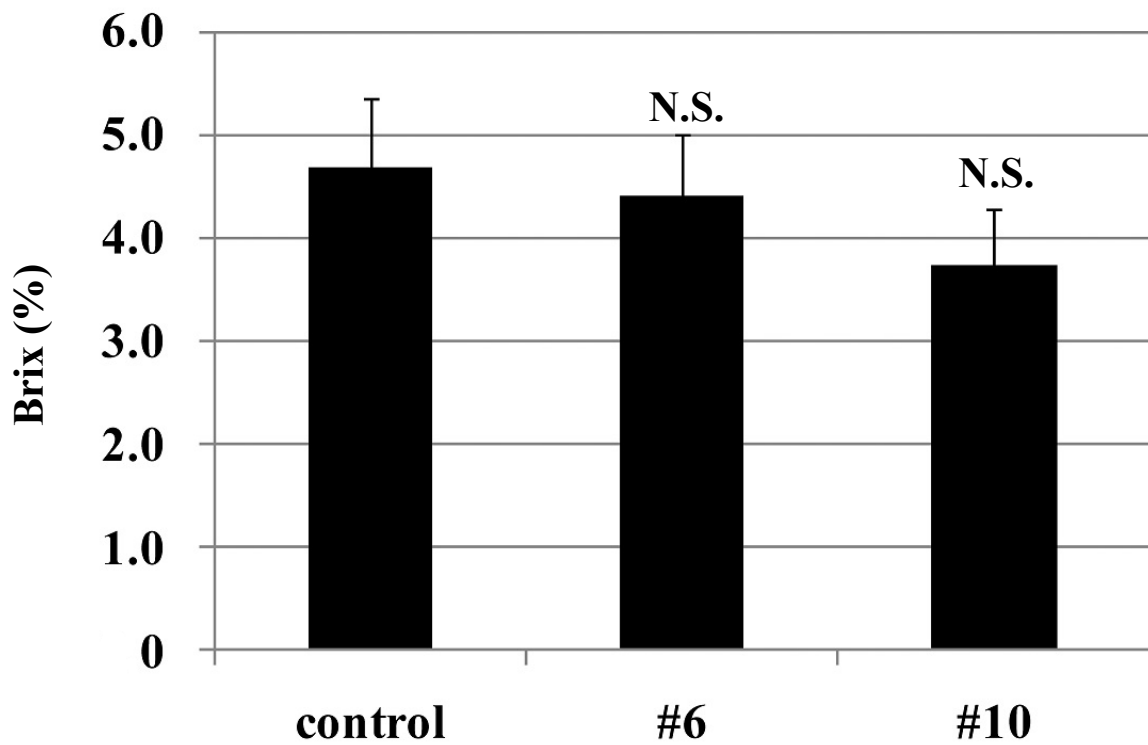
タマネギ細胞破碎後の催涙成分 (LF) とピルビン酸生成量を測定した。LFはタマネギの催涙性と辛みの両方を担っている物質である。ピルビン酸は、RENCISOがalliinaseに分解された際に生成する分解物であり、lachrymatory factor synthase (LFS) の存在下ではLF生成量と正相関することから、古くからタマネギの辛みを簡便、かつ迅速に測定する方法に利用されてきた。

2系統 (#6, #10) のLF生成量は、コントロールとした長日系タマネギ (品種：札幌黄) と比較して約7.5分の1に減少した (**Fig. 4-7**)。また、ピルビン酸生成量は、コントロールタマネギと比較して5.5分の1、短日系品種と比較して3.8分の1に有意に減少していた (**Fig. 4-8**)。これらの結果は、官能評価の結果とも一致した。

2系統（#6, #10）のLF生成量（ $<1,000,000$  Peak Area/ $\mu$ l）およびピルビン酸生成量（ $<2$   $\mu$ mol/g fw）は、これまで著者らが分析した非遺伝子組み換えタマネギ品種の中で最も低かった（LF生成量  $>2,000,000$  Peak Area/ $\mu$ l, ピルビン酸生成量  $>2.2$   $\mu$ mol/g fw）。また、2系統（#6, #10）のピルビン酸生成量は、低硫黄肥料または硫黄欠乏土壌で栽培された'Vidalia'などの辛みの弱いタマネギとして報告されている品種の文献値の約40%であり、有意に低い値であった（Randle *et al.* 1993, Rnadle *et al.* 1995, Kiramura *et al.* 1997）。これらの結果から、2系統（#6, #10）は、私が知る限り、栽培品種の中で最も辛みの弱いタマネギであることが示された。

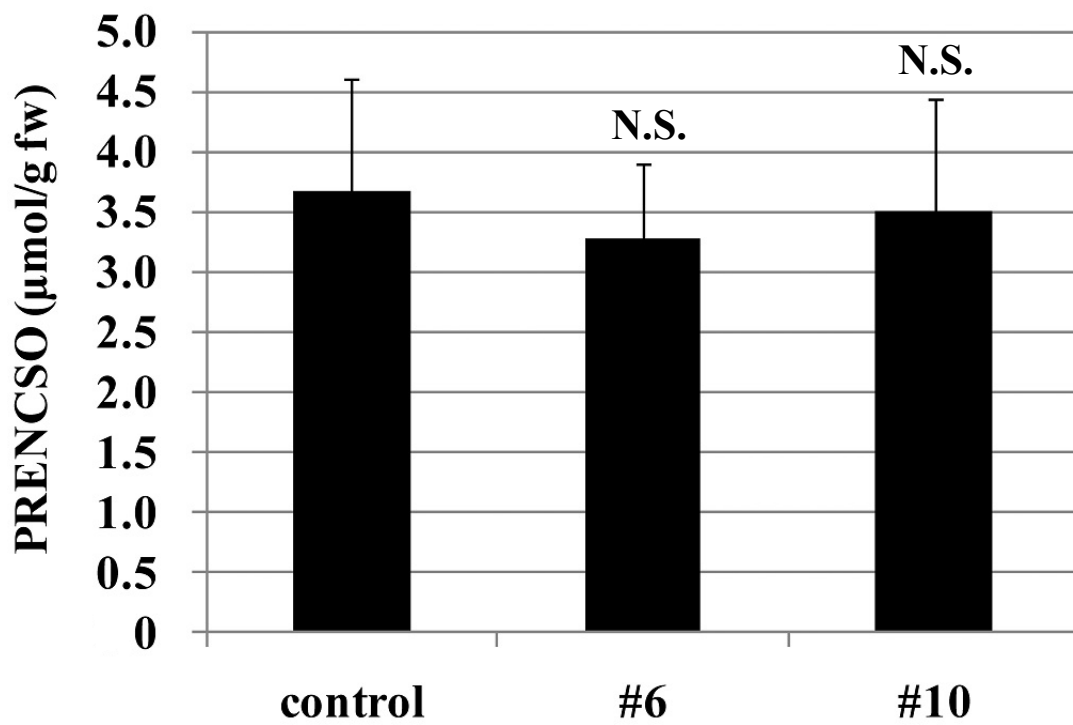
2系統（#6, #10）に精製alliinase（12.5 Units）を添加してタマネギ細胞を破碎した際のLF生成量は、2系統共にコントロールタマネギと同程度まで増加した（Fig. 4-7）。この結果から、2系統（#6, #10）のLFSの活性は、コントロールのタマネギと同レベルであることが示唆された。

前記PRENCISO含有量の定量の結果、および本結果より、2系統（#6, #10）で組織破碎時のピルビン酸生成量やLF生成量が低下した要因は、alliinaseの働きが抑制されているためであると考えられた。

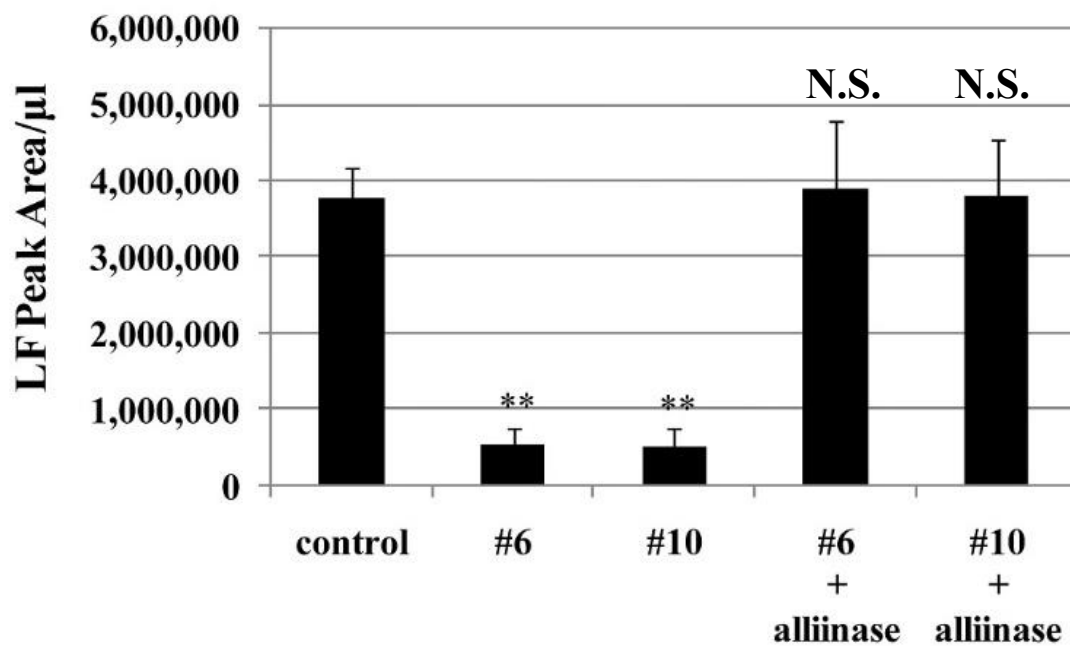


**Fig. 4-5. Brix measured in onion bulbs (control, #6 and #10).**

The control represents the normal onion grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. Data are mean  $\pm$  SD, n = 5 (control), n = 19 (#6, #10). No significant differences were observed between control and the tearless, non-pungent onions (#6, #10) by Dunnett's test. N.S., not significant.

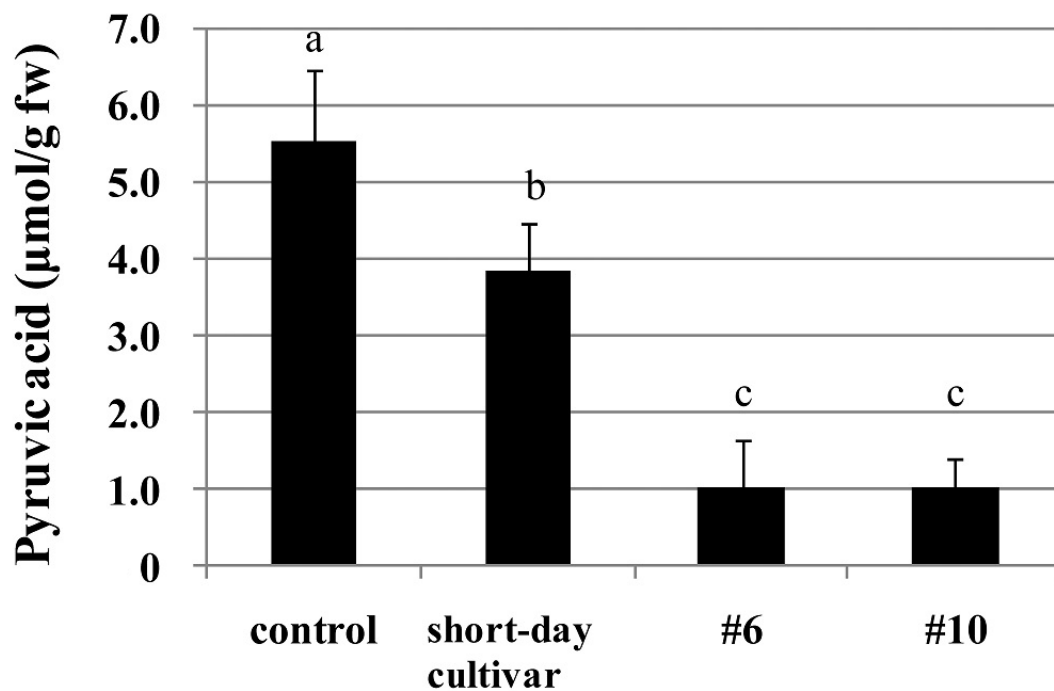


**Fig. 4-6. PRENCISO concentration in heated onion bulbs (control, #6 and #10).** PRENCISO concentrations were presented as µmol per g fresh onion weight. The control was the normal onion grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. Data are mean ± SD, n = 5 (control), n = 19 (#6, #10). No significant differences were observed between control and (#6, #10) by Dunnett's test. N.S., not significant.



**Fig. 4-7. LF production in onion bulbs (control, #6 and #10).**

The LF productions are presented as LF peak area per  $\mu\text{l}$  of supernatant. The control represents the normal onion grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 5$  (control),  $n = 19$  (#6, #10). Significant differences Dunnett's test ( $P < 0.01$ ) are indicated by \*\*. N.S., not significant.



**Fig. 4-8. Pyruvic acid concentration in onion bulbs (control, short-day onion, #6 and #10).**

Pyruvic acid concentrations are presented as  $\mu\text{mol}$  per g fresh onion weight. The control represents the normal onion grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. The short represents short day onions collected from 5 different areas (Chiba, Nagasaki, Saga, Kagoshima and Shizuoka) in Japan. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 5$  (control),  $n =$  a total of 5 (one from each areas (short),  $n = 19$  (#6, #10). Significant differences by Tukey–Kramer test ( $P < 0.01$ ) are indicated by different letters.



#### 4-5 Alliinase抑制原因の解析

作出した2系統（#6, #10）のalliinaseの働きが抑制されている原因を検討した。検討した内容は (a) Alliinase活性の評価、(b) Alliinaseタンパク質発現量の定量、(c) Alliinase mRNA発現量の定量、(d) Alliinase RNAseq解析、および (e) Alliinase ゲノミックPCR解析である。

##### 【材料と方法】

(a) Alliinase活性の評価に用いたPRENCISO量の定量、および (b) Alliinaseタンパク質発現量の定量の1つに用いたEnzyme-Linked Immunosorbent Assayは、前述の「4-3. Alliinase抑制タマネギの作出」に記載した方法を用いた。

##### (b) Alliinaseタンパク質発現量解析: Western Blot解析

分析サンプルのタンパク質は、-80 °Cで凍結保存していたタマネギ球の組織（500 mg）に500 mlのPBSバッファーを加え破砕し、抽出した。その後、前述のEnzyme-Linked Immunosorbent Assayと同様にProtein Assay Kit（Bio-Rad）で総タンパク質量を定量した。ポジティブコントロールとしてのalliinaseは、非加熱ニンニク片から精製した。精製したニンニクalliinaseは、同様にProtein Assay Kit（Bio-Rad）を用いて定量した。

Coomassie Brilliant Blue（CBB）染色、およびWestern blot用に、それぞれ抽出した分析サンプルの総タンパク質9 µg、および精製ニンニクalliinase 125 ngをLaemmli Sample Buffer（Bio-Rad）を用いてプロトコルに従い処理した。その後、2枚の10%（w/v）ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。電気泳動後のゲル1枚はCBBで染色し、もう1枚のゲルはTrans-Blot SD Cell（Bio-Rad）を用い

てpolyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad) へ電氣的に転写した。転写したメンブレンを5%スキムミルク溶液でブロッキングし、4-3で用いたalliinase抗体で一晩インキュベートした。その後、過剰な抗体をTween-PBSバッファーで30分間、2回洗淨することにより除去し、メンブレンを抗ラットIgG溶液で1時間インキュベートした。再び、過剰な抗体をTween-PBSバッファーで30分間、3回洗淨して除去した後、alliinaseタンパク質をHRP Conjugate Substrate Kit (Bio-Rad) を用いてプロトコルに従い検出した。メンブレンをChemiDoc XRS (Bio-Rad) で画像化した。

#### (c) Alliinase mRNA発現量解析

Total RNAは、液体窒素を用いて凍結したタマネギ球の組織100 mgから、RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて、メーカーのマニュアルに従って抽出した。抽出したRNAはReverTra Ace RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて逆転写し、cDNAを合成した。mRNAの発現量を測定するため、7900 HT Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) 、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いてリアルタイム定量RT-PCR解析を行った。リアルタイム定量RT-PCRのプライマー、増幅条件は下記で実施した。mRNAの発現量は、内部標準遺伝子として各実験で使用したUbiquitinの発現量に対する比率で示した。

#### オリゴヌクレオチドプライマーセット

Ubiquitin (内部標準遺伝子) とalliinaseのオリゴヌクレオチドプライマーセットは、GenBankデータベースの配列データから設計した。

- Ubiquitin (GenBank accession number AA451588)

Fwd: 5'- ACGATTACACTAGAGGTGGAGAGCTC -3'

Rev: 5'- CCTGCAAATATCAGCCTCTGCT -3'

- Alliinase (GenBank accession number L48614, AF121962, FJ446579, Z12621, AF124405)

Fwd: 5'- AATGAGACCTCCATCCCCATC -3'

Rev: 5'- TCGAAACCCTCTCCACTTTG -3'

#### 増幅条件

Initialization	:	95 °C	—	1 min	
Denaturation	:	95 °C	—	0.25 min	} x 45 cycles
Annealing	:	55 °C	—	0.25 min	
Extension	:	72 °C	—	0.5 min	
Final extension	:	72 °C	—	5 min	

#### (d) Alliinase RNAseq解析

Total RNAは、液体窒素を用いて凍結したタマネギ球の組織100 mgから、RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) を用いて、メーカーのマニュアルに従って抽出した。さらに採取したtotal RNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen)、およびRNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて、DNase処理を行った。処理後のtotal RNAは、Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) 、および Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) による濃度測定、RNAの品質確認を

行った。品質確認において、サンプルのA260/A280が1.8以上、かつRNA Integrity Numberが8.0以上であることを確認し、TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてメーカーのマニュアルに従い、シーケンスライブラリーを調製した。調製したシーケンスライブラリーは次世代シーケンサーHiSeq (Illumina) を用いて、下記の条件でシーケンス解析を行った。

### シーケンス解析

シーケンス解析は、下記条件で実施した。

解析方法	Paired End
検体数	6
レーン数	3
読み取り塩基長	100塩基/リード
取得リード数	1億リードペア
取得データ量	20 Gb/レーン

### データ処理

各サンプル1億リードペア以上のデータを取得した。得られたデータには、下記の情報処理を実施した。

Chastityと呼ばれる計算式を用い、蛍光純度の低いデータを除去した。「Chastity」とは、4種類の塩基からのシグナル値の内、最大のをI1、次のものをI2とした場合、「 $I1 / (I1 + I2)$ 」で示す式で表され、本実験においては「 $I1 / (I1 + I2) > 0.6$ 」の条件でデータの選別を行った。選別したデータを、各サンプル固有のIndex情報によりサンプル毎に振り分けた。アダプター配列を含むリードを除去し、さら

にQuality Value20以上の塩基を90%以上含むリードペアを抽出した。

各サンプルのデータをすべて使用し、Trinity (URL: <http://trinityrnaseq.sourceforge.net/index.html> version 2013-02-25) を用いてDe novoでアセンブルを行った。アセンブルデータ (推定Transcript配列) について、BLAST検索によるアノテーション付与を行った。アノテーションのプログラムにはBLASTXを、データベースにはNCBIのRefSeq-Fungi、RefSeq-Microbial、RefSeq-Plantのアミノ酸配列、およびNCBIの分類でAllieaeに登録されているアミノ酸配列と遺伝子配列をアミノ酸配列に変換した配列を統合したデータベースを用いた。BLASTXのパラメーターは、`evaluate 1E-5 / num_alignments 100 / outfmt "6 qseqid sseq id pident length mismatch gapopen qstart qend sstart send evaluate bitscore qlen slen stitle qcovs qcovhsp"/`とし、その他はデフォルト条件を使用した。

推定Transcript配列に対し、発現解析のためTrinityを用いて各サンプルのデータをマッピングした。マッピング結果から、edgeRを使用して2群間の発現比較検定を実施し、両群間で発現量に差のある遺伝子配列を抽出した。有意差は、p-valueが0.05以下を基準とした。その後、BLASTXでのアノテーションでalliinaseとアノテーションされた遺伝子を抽出した。

#### (e) AlliinaseゲノミックPCR解析

タマネギゲノムDNAは、液体窒素を用いて凍結したタマネギ球の組織100 mgから、DNeasy Plant mini kit (Qiagen) を用いて、メーカーのマニュアルに従って抽出した。調整したゲノムDNAを鋳型としてKOD FX (Toyobo) を用いたPCRを行い、MultiNA電気泳動装置 (Shimazu) を用いて増幅産物の解析を行った。

分析サンプルは、**Table. 4-2**に示す産地や品種の異なる市販品種14種類の

タマネギ、コントロールタマネギ、作出した2系統（#6, #10）を用いた。PCR条件は下記を用いた。

#### オリゴヌクレオチドプライマーセット

遺伝子番号1のalliinaseを特異的に増幅するプライマーの頭文字を「S」とした。

その他のalliinaseを増幅するプライマーを「U」とした。

市販品種14種類のタマネギ、コントロールタマネギのPCRでは、SF1-SR1、SF2-SR3、UF1-UR1、UR2-UR3の4セットを、#6のPCRではSF1-SR1、SF2-SR3、UF1-UR1、UR2-UR3、SF1-SR3、UF1-UR3のプライマーセットを、#10のPCRではSF1-SR3、UF1-UR3のプライマーセットを用いた。

- SF1: 5'- TGGCAGTAATAAAAATGCCAAGCCTT -3'
- SF2: 5'- ATGCATAATCATGTCTTCATTTGTT -3'
- SR1: 5'- ACAGTTTATATTAGCCACTGCTTCT -3'
- SR3: 5'- ATTTGCATCCCTTTATTACTTCATG -3'
- UF1: 5'- TGGCAGTAGTAAAATGCCAAGCCTA -3'
- UF2: 5'- ATGCATAATCATGTCTTCATTTGTC -3'
- UR1: 5'- ACAGTTTATATTGGCCACTGCCTCC -3'
- UR3: 5'- ATTTGCATCCCTTGATTACTTCCTT -3'

### 増幅条件

Initialization	:	94 °C	—	2 min	
Denaturation	:	98 °C	—	10 sec	x 35 cycles
Annealing	:	60 °C	—	30 sec	
Extension	:	68 °C	—	15 sec	

### **【結果および考察】**

#### (a) Alliinase活性の評価

非加熱（生）の状態では細胞破碎した際のPRENCISO量は、コントロールタマネギの0に対して、2系統（#6, #10）では3.0～5.4 μmol/gを示した。この値は、**Fig.4-6**に示した2系統（#6, #10）の破碎前のPRENCISO量に等しく、2系統（#6, #10）のPRENCISOはalliinaseによって分解されなかったことを示唆した（**Fig. 4-9**）。つまり、2系統（#6, #10）は、alliinase活性が著しく低下している可能性が強く示唆された。

#### (b) Alliinaseタンパク質の発現量の定量

2系統（#6, #10）のAllinaseタンパク質発現量は、ELISAでは定量下限値以下であった（**Fig. 4-10A**）。また2系統（#6, #10）のタマネギ球のSDS PAGEとWestern Blotでは、2系統共にalliinaseタンパク質は検出されなかった（**Fig. 4-10B, C**）。

以上の結果より、2系統（#6, #10）のalliinase活性低下の要因は、alliinaseタンパク質の発現低下によることが示された。

### (c) Alliinase mRNAの発現量の定量

Alliinase遺伝子の発現量は、定量リアルタイムRT-PCR (qRT-PCR) で行った。その結果、2系統 (#6, #10) のalliinase mRNAの発現量は、それぞれコントロールとしたタマネギの1%未満であることが明らかとなった (Fig. 4-11)。この結果から、2系統 (#6, #10) におけるalliinaseタンパク質発現量の低下は、転写過程におけるalliinase mRNAの発現量の低下に起因することが明らかとなった。

### (d) Alliinase RNAseq解析

作出したタマネギ#6 3個体、コントロールタマネギ3個体すべての個体から、1億2000~3000万リードのデータが得られ、分析自体は正常に実施されたと判断した。

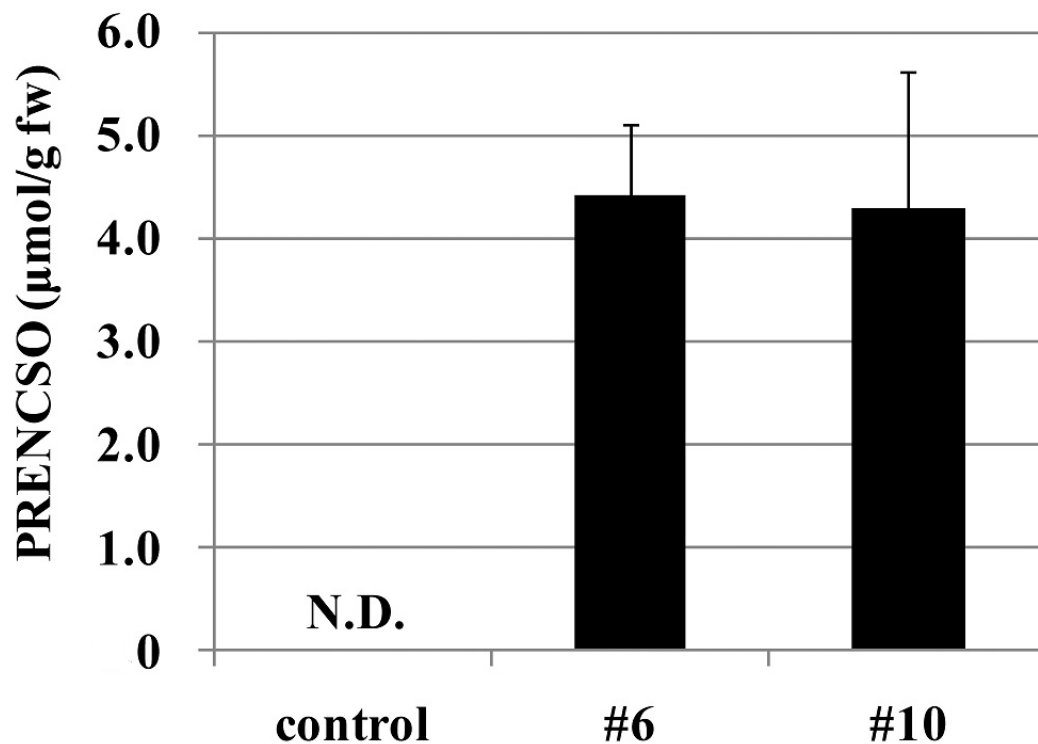
アセンブルした結果、約41万個のコンティグ配列が得られ、アノテーションできたのはその約半数であった。約41万コンティグの中で「alliinase」とアノテーションが付与された配列は、44個であった。44個の配列のアノテーションは、[alliinase]、[alliinase partial]、[alliinase-like]、[root-type alliinase]であった。その中からタマネギの「alliinase」とさらに絞り込んだ結果、29個が該当した。複数の遺伝子が報告されているタマネギのalliinaseは、mRNAレベルでは全部で29種類発現していることが確認された。さらに、29個の中で、遺伝子番号1で示す1種類のalliinaseの発現量が極めて高く、この遺伝子が機能的にはdominantであると考えられた (Table 4-1)。このような中、作出したタマネギ#6では、高発現している遺伝子番号1のalliinaseの発現が抑制されていた。この結果は、複数の遺伝子座にあると報告されているタマネギのalliinaseについて、機能しているalliinaseは限られており、その遺伝子に変異が生じた可能性を示唆した。



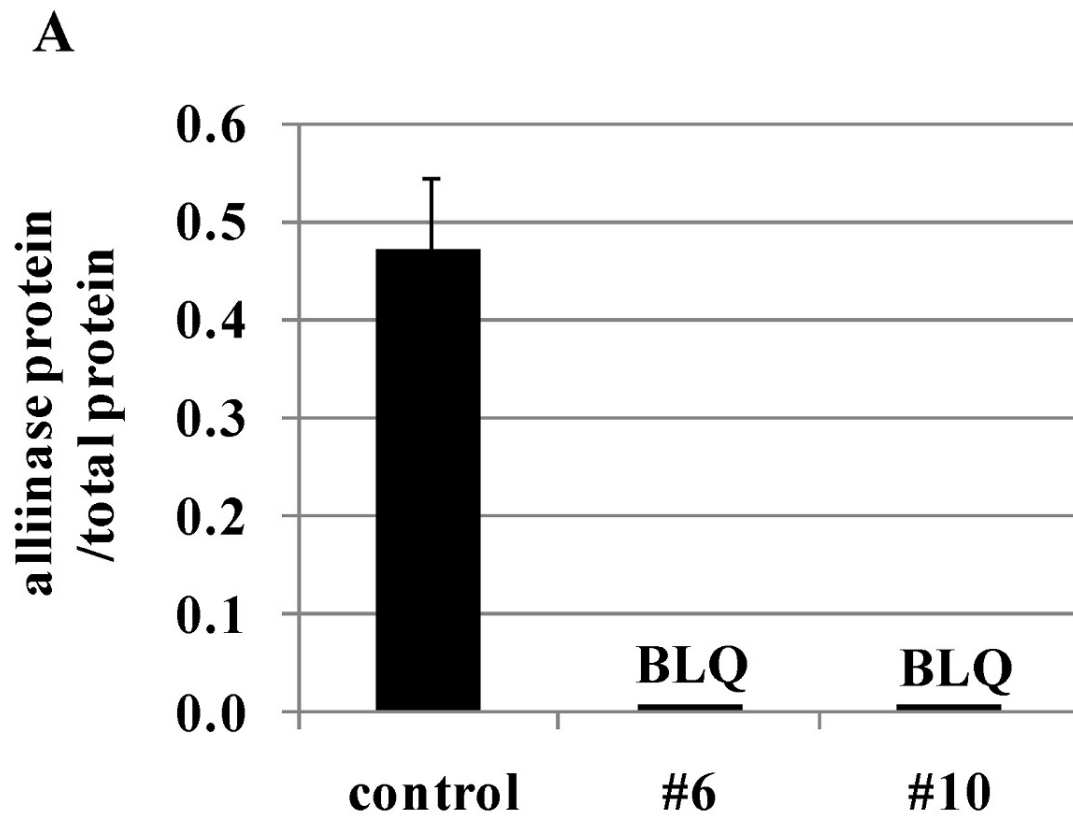
#### (e) Alliinase ゲノミックPCR解析

RNAseqの結果より、作出したタマネギにおいてalliinaseの発現が抑制されている原因は、1種類のalliinaseの変異である可能性が示された。そこで、遺伝子番号1のalliinaseがゲノム上から欠失した可能性を、ゲノミックPCRで確認した。市販品種14種類とコントロールタマネギは4種類のプライマーセットいずれからも目的の増幅産物が確認されたのに対して、作出した2系統（#6, #10）は遺伝子番号1のalliinaseの増幅が確認されなかった（**Fig. 4-12**）。この結果は、作出した2系統（#6, #10）では、ゲノム上から催涙性や辛みの発現に重要なalliinase（遺伝子番号1）が欠失していることを示した。

以上の結果から、作出した2系統（#6, #10）は、高発現しているalliinaseがゲノム上から欠失したため、alliinaseが働かずそれ以降の反応が進まない。それゆえ催涙・辛み成分であるLFをはじめ、PRENCSO分解に伴い生成する様々な物質が生成しないと結論付けた。

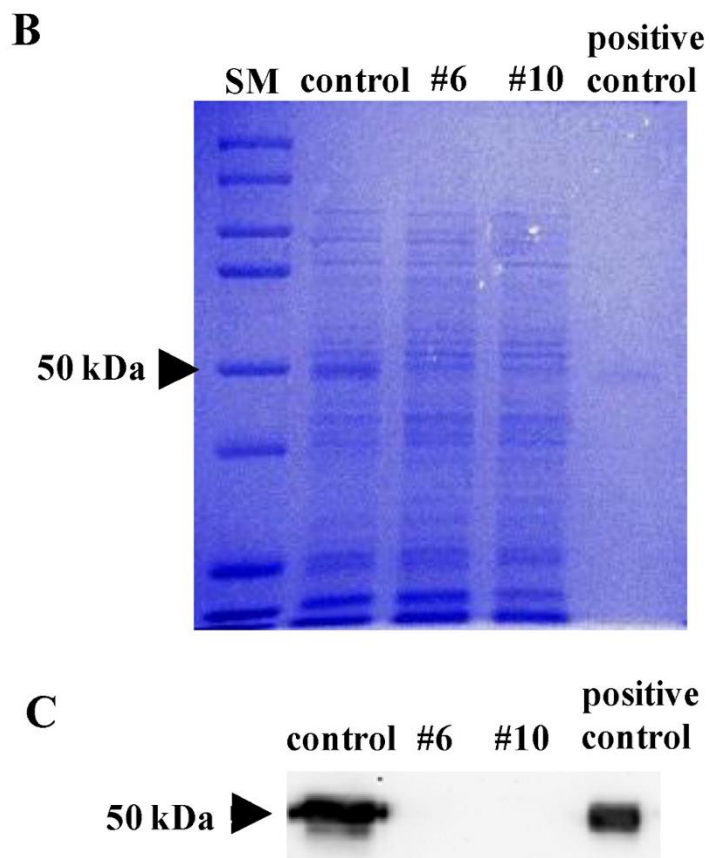


**Fig. 4-9. PRENCISO concentration in unheated onion bulbs (control, #6 and #10).** PRENCISO concentrations are presented as µmol per g fresh onion weight. The control represents the normal onion grown in the same field, the same cultivation method as #6 and #10. Data are mean ± SD, n = 2 (control), n = 8 (#6) and n = 9 (#10). N.D., not detected.



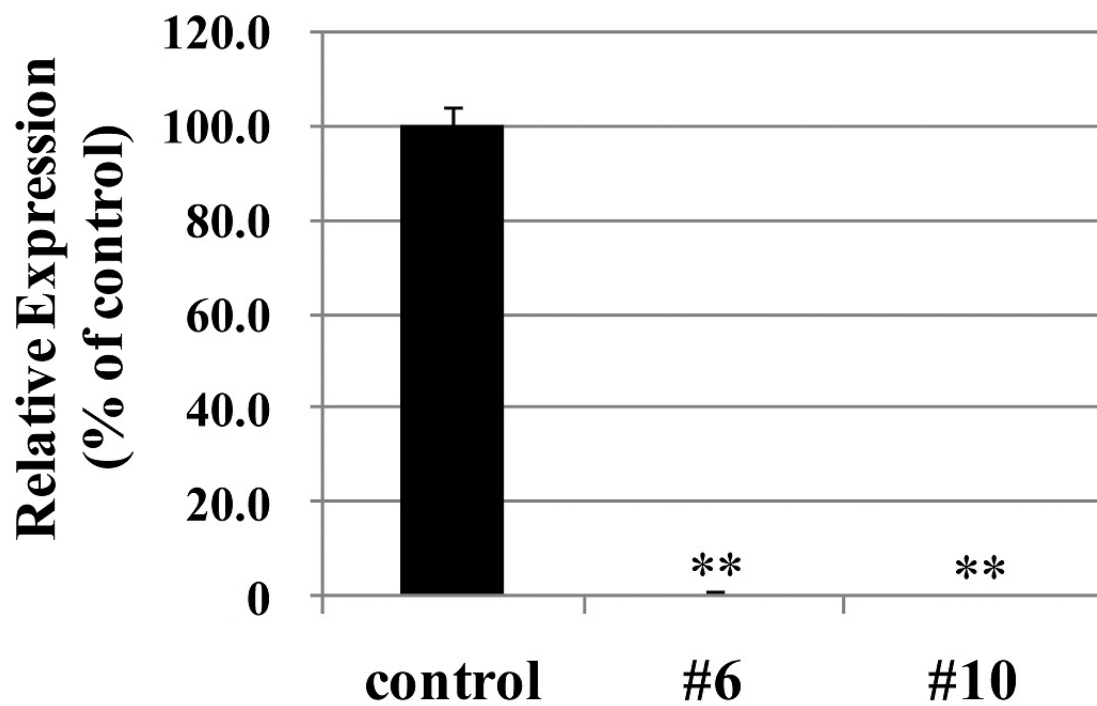
**Fig. 4-10. Protein expression of alliinase in onion bulbs (control, #6 and #10).**

Protein expression of alliinase in control, #6 and #10 are compared by ELISA (A) and western blot assay (B and C). The control represents the normal onions grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. The results of ELISA are presented as mean  $\pm$  SD, n = 5 (control), n = 19 (#6, #10). BLQ, below the limit of quantitation.



**Fig. 4-10. Protein expression of alliinase in onion bulbs (control, #6 and #10).**

Protein expression of alliinase in control, #6 and #10 are compared by ELISA (A) and western blot assay (B and C). The control represents the normal onions grown in the same field and by the same cultivation method as #6 and #10. The alliinase purified from fresh garlic cloves by using a hydroxyapatite column and a concanavalin A–sepharose 4B column was used as the positive control.



**Fig. 4-11. Alliinase mRNA levels in onion bulbs (control, #6 and #10).**

The mRNA expression levels of alliinase were quantified by real-time PCR. The expression levels are normalized to the amount of ubiquitin transcript and presented in percentage relative to the mean expression level in the control bulbs. Data are mean  $\pm$  SD, n = 3 (each sample). Significant differences by Dunnett's test ( $P < 0.01$ ) are indicated by \*\*.

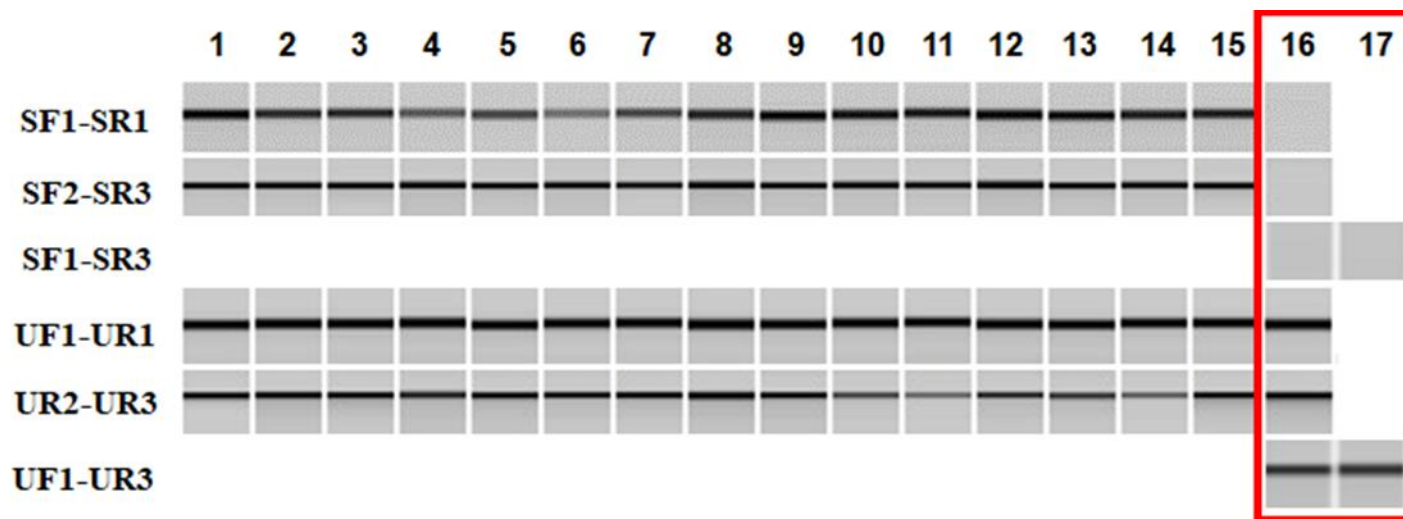
**Table 4-1. Comprehensive gene expression analysis in onion bulbs (control, #6).**

The analyses were performed by next-generation sequencing, BLASTX, Trinity and edgeR. n = 3(each sample). P value is less than 0.05.

Gene No.	Expression level						p-value	Results of annotation
	#6-1	#6-2	#6-3	Control 1	Control 2	Control 3		
1	0.03	0.09	0.01	1066.44	120.36	68.41	2.9 E-15	alliinase
2	0.50	0.47	0.58	0.53	0.04	0.00	4.3E-01	alliinase-like
3	0.01	0.15	0.00	0.03	0.00	0.00	3.2E-01	alliinase-like
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	1.1E-01	alliinase-like
5	0.33	0.00	0.25	0.72	0.27	0.52	1.6E-01	alliinase-like
6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	2.2E-01	alliinase-like
7	0.12	0.01	0.10	0.28	0.00	0.06	5.3E-01	alliinase-like
8	1.72	1.06	0.97	1.16	1.33	1.83	5.4E-01	alliinase-like
9	4.48	4.66	4.29	3.86	4.28	3.77	8.9E-01	alliinase-like
10	0.85	0.81	0.94	0.83	0.34	1.62	6.9E-01	alliinase-like
11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.0E+00	alliinase-like
12	11.53	10.46	7.83	12.12	22.63	18.87	1.1E-01	alliinase-like
13	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	3.5E-02	alliinase-like
14	0.39	0.39	0.17	0.00	0.17	0.28	4.5E-01	alliinase-like
15	2.36	2.14	2.94	1.15	2.86	3.12	8.4E-01	alliinase-like
16	0.00	0.00	0.00	0.18	0.00	0.00	1.5E-01	alliinase-like
17	4.86	4.43	5.14	8.32	11.59	11.48	4.1E-02	alliinase-like
18	1.42	0.92	1.16	1.32	1.44	2.46	2.9E-01	alliinase-like
19	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.00	2.3E-01	alliinase-like
20	0.00	0.06	0.13	0.01	3.59	4.60	9.9E-04	alliinase-like
21	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.14	8.9E-02	alliinase
22	0.00	0.00	0.13	0.00	0.25	0.23	3.6E-01	alliinase precursor
23	0.05	0.00	0.56	10.54	0.05	0.11	1.8E-02	alliinase-like
24	3.98	4.55	5.19	0.56	0.00	0.00	1.8E-03	alliinase-like
25	0.21	0.00	0.00	0.46	0.00	0.21	3.3E-01	alliinase-like
26	0.00	0.00	0.00	0.13	0.39	0.00	3.7E-02	alliinase-like
27	0.00	0.00	0.00	0.29	0.05	0.16	2.5E-02	alliinase-like
28	0.00	0.00	0.00	0.56	0.00	0.25	8.5E-02	alliinase-like
29	0.53	0.87	0.77	0.68	1.79	1.57	2.3E-01	alliinase-like

**Table 4-2. The list of onion varieties used for analyses of alliinase genomic PCR in Fig. 4-12 (14 varieties of commercially available onions, control, #6 and #10).**

No	Region of production	Type
1	Saga	Short-day
2	Kagoshima	Short-day
3	NZ	Long-day
4	Shizuoka	Short-day
5	Kumamoto	Short-day
6	Nagasaki	Short-day
7	Awaji	Intermediate-day
8	Hokkaido	Long-day_red onion
9	Chiba	Short-day
10	Italy	Long-day_red onion
11	Hokkaido	Short-day_white onion
12	Hokkaido	Long-day_red onion
13	Hokkaido	Long-day
14	Hokkaido	Long-day
15	Hokkaido	Long-day (control)
16	Hokkaido	#6
17	Hokkaido	#10



**Fig. 4-12. Analyses of alliinase genomic PCR in onion bulbs (14 varieties of commercially available onions, control, #6 and #10).** The lane numbers correspond to the onion variety numbers in Table 4-2. Lanes 1 to 14 show the analysis results for commercially available varieties, lane 15 is the analysis results for the control variety, and lane 16 and 17 are the analysis results for onion #6 and #10. Gene No.1 alliinase and the other alliinase were detected by using various primer sets. Gene No.1 alliinase was amplified by using SF1-SR1, SF2-SR3 and SF1-SR3. The other alliinase was amplified by using UF1-UR1, UF2-UF-3 and UF1-UR3.



#### 4-6 研究成果の産業有用性

作出したalliinase抑制タマネギの産業有用性として、(a) Alliinase抑制タマネギのピンク抑制効果の確認、および(b) その特性が次世代へ遺伝し育種素材として利用可能かを検証した。

##### 【材料および方法】

###### (a) ピンク抑制反応の抑制実験

カット野菜の製造工程を模して実験を行った。具体的には、保護葉を除いたタマネギをスライサーで、均一の厚さになるようにスライスした。その後、200 ppmの次亜塩素酸水、または蒸留水に1時間浸漬した。余分な水分を除いた後、目視でピンクや赤色への変色の程度を評価した。

###### (b) 特性が次世代へ遺伝するかの確認

Alliinase抑制タマネギの形質が次世代へ遺伝するか否かを確認するため、他品種との交配によりF<sub>2</sub>世代を作出し、その遺伝子解析と表現型解析を行った。具体的には、(株)植物育種研究所が育成した細胞質雄性不稔タマネギとalliinase抑制タマネギを「4-3. Alliinase抑制タマネギの作出」に記載した北海道の標準的な採種方法に従い栽培し、開花時に細胞質雄性不稔タマネギの雌蕊へalliinase抑制タマネギの花粉を受粉させ、F<sub>1</sub>タマネギ種子を得た。そのF<sub>1</sub>タマネギ種子を4-3記載の北海道の標準的な栽培方法にて栽培し、F<sub>1</sub>タマネギ球を収穫した。翌年4月より収穫したF<sub>1</sub>タマネギ球を自殖し、F<sub>2</sub>タマネギ種子を得た。その後、得られたF<sub>2</sub>タマネギ種子を栽培し、F<sub>2</sub>タマネギ球を得た。得られたF<sub>2</sub>タマネギ球、およびその栽培過程で得たタマネギの葉を用いて、下記の分析を行った。

## 遺伝子解析

F<sub>2</sub> タマネギ球を栽培する過程において 4,249 球のタマネギの葉をサンプリングし、-30 °Cで凍結保存した。このタマネギ葉を 5 mm 角にカットし、ジルコニアボール(φ=3 mm, Nikkato)を3つ入れた2 ml セーフロックチューブ(Eppendorf)に採取した。100 µl の Buffer A (組成: 100mM Tris-HCl (pH 9.5)、1M KCl、10mM EDTA) を加え、Mixer Mill MM 300 (Qiagen) を用いて 30 Hz で 6 分間破碎した。その後、遠心分離 (15,000 rpm, 4 °C, 10min) を行い、上清を遺伝子解析用の DNA として使用した。

プライマーセットは「4-5. Alliinase ゲノミック PCR 解析」記載の SF2-SR1、SF1-SR1、UF2-UR1 の3セットを用いた。増幅条件も 4-5 と同様とした。

## 表現型解析

遺伝子解析で SF2-SR1 と SF1-SR1 のプライマーセットで増幅を示さず UF2-UR1 のみで増幅した個体 (選抜当たり球) 94 球と全てのプライマーセットで増幅を示した個体 (選抜外れ球) 30 球を用いて、「4-4 Alliinase 抑制タマネギの特性解析」に記載した方法で官能評価、およびピルビン酸測定を実施した。

### **【結果および考察】**

#### (a) ピンキング反応の抑制効果

スライスしたalliinase抑制タマネギ (#6) と北海道産の一般的なタマネギを次亜塩素酸 (200 ppm) に浸しピンクや赤色への変色程度を比較評価した結果、alliinase抑制タマネギでは変色が認められなかった。この結果より、作出したalliinase抑制タマネギは変色現象を抑制できることが確認できた (Fig. 4-13)。

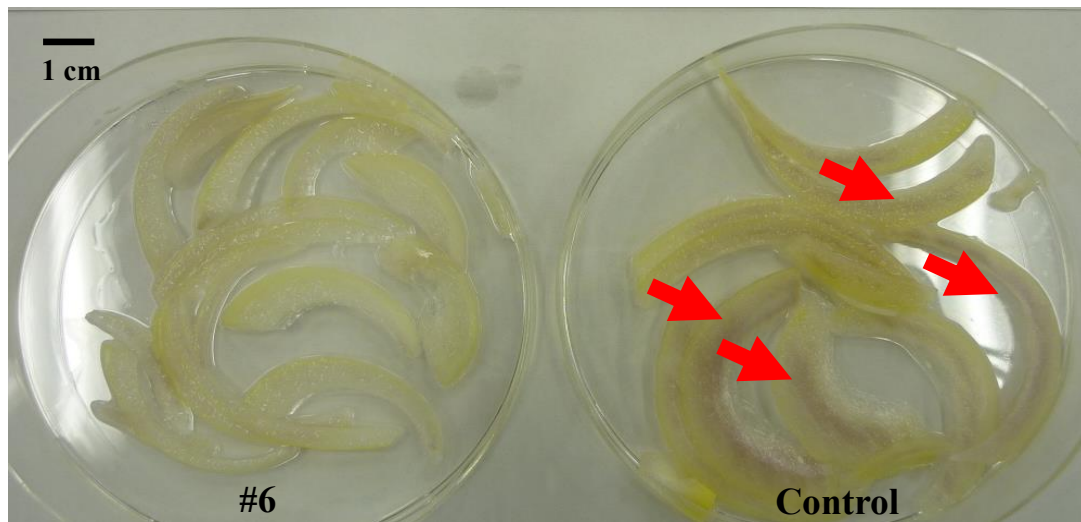
タマネギのピンクングの問題は、1950年代に論文で報告されてから半世紀にわたって根本的に抑制できていなかったが、本タマネギの開発で、変色現象を根本的に抑制できる可能性を示すことができた。

#### (b) 形質が次世代へ遺伝するかの確認

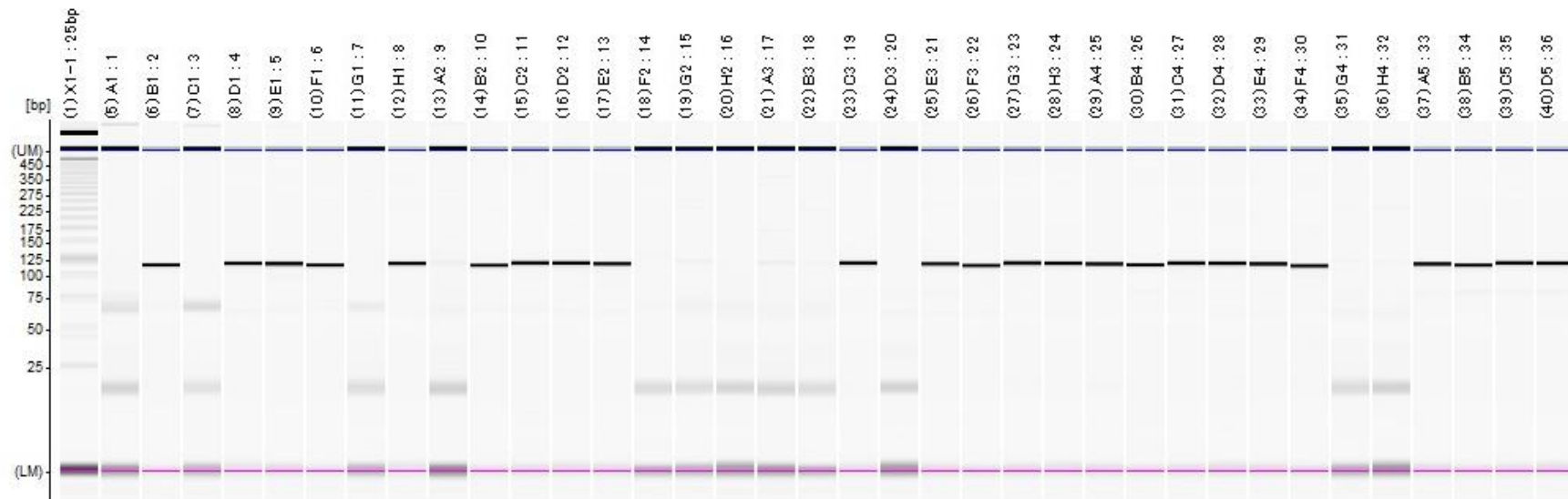
作出したalliinase抑制タマネギが育種素材として活用できるか否かを明らかにする目的で、alliinase抑制タマネギ (#6) と細胞質雄性不稔タマネギを交配、栽培して得たF<sub>2</sub>タマネギの遺伝子解析、表現型解析を行った。

遺伝子解析の結果、F<sub>2</sub>集団の種子から栽培した4,249球の内、866球が遺伝子番号1のalliinaseが欠失したタマネギであった(以下、選抜当たり球)。出現率は20.3%であり、ほぼメンデルの法則に従って目的個体が出現した。**Fig4-14**にSF2-SR1で解析した一例を示した。

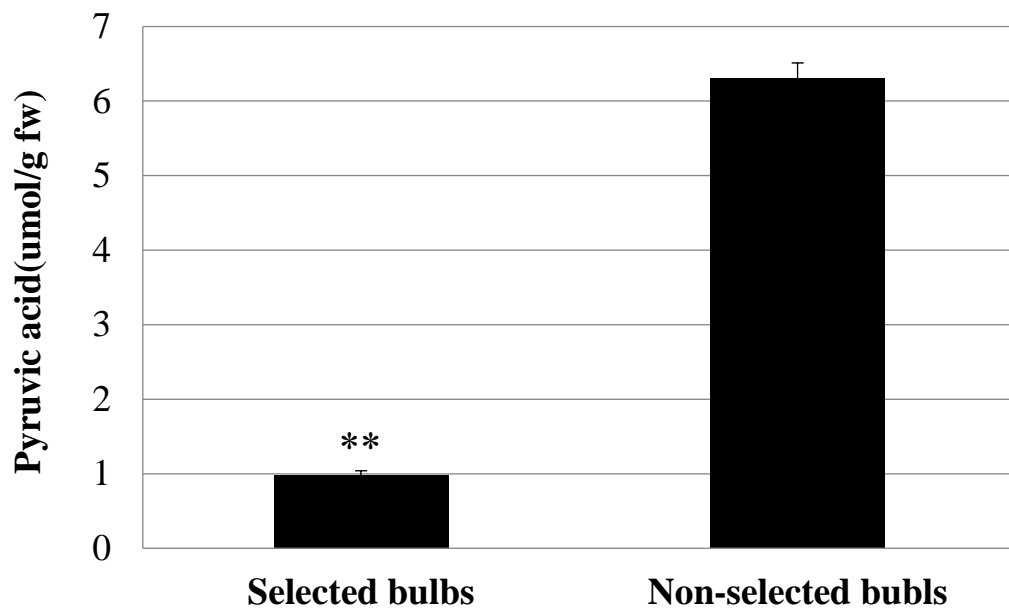
PCRでの選抜結果と表現系の一致を確認するため、選抜当たり球94球と外れ球30球の官能評価、および催涙性・辛みの指標であるピルビン酸量を測定した。官能評価の結果、選抜当たり球はすべて催涙性や辛みを感じる球はなかった(data not shown)。選抜当たり球のピルビン酸生成量は、親系統 (**Fig. 4-8**) と同様に1 μmol/g程度であり、選抜外れ球と比較すると有意に抑制されていた (**Fig. 4-15**)。以上の結果より、開発したalliinase抑制タマネギの「催涙性や辛みのない」特性は後代へ遺伝することが明らかとなり、作出したタマネギは、育種素材として様々なタマネギと交配することで、食の可能性を広げることができる新たなタマネギの作出に有用であると判断した。



**Fig. 4-13. A photograph of the degree of discoloration of #6 and control onion.** The red arrows show discoloration areas. The bar shown in the photograph indicates 1 cm.



**Fig. 4-14. One example of the detection results for alliinase gene No.1 in amplification products of PCR on the genomic DNAs of leaves of F<sub>2</sub> population derived from #6 as templates using SF2-SR1 as a primer set.**  
The upper column shows the names of the F<sub>2</sub> onion samples.



**Fig. 4-15. Pyruvic acid concentration in onion bulbs (selected bulbs and non-selected bulbs).**

Pyruvic acid concentrations are presented as  $\mu\text{mol}$  per g fresh onion weight. Data are mean  $\pm$  SD, n = 94 (selected bulbs), n = 30 (non-selected bulbs). Significant differences by t test ( $P < 0.01$ ) are indicated by \*\*.

#### 4-7 第4章の結論

重イオンビームを用いた変異誘発と選抜育種を組合せることにより、催涙性や辛みの発現に寄与する alliinase（遺伝子番号 1 の alliinase）がゲノム上から欠失した 2 系統（#6, #10）のタマネギの作出に成功した。このタマネギの特性を詳細に解析する中で、タマネギゲノム中に複数存在する alliinase 遺伝子のうち、催涙や辛み物質である LF をはじめ様々な物質生成の起点である PRENCISO の分解に大きく寄与する alliinase は、遺伝子番号 1 の alliinase であることを明らかにした。

今回、作出に成功したタマネギにおいても、遺伝子番号 1 の alliinase がゲノム上から欠失しており、そのためタマネギ細胞破碎時も基質である PRENCISO が alliinase により分解されず、催涙や辛み成分である LF をはじめタマネギの細胞破碎に起因する様々な物質の生成が行われなかった。

このタマネギの作出の意義として下記の 3 項目が考えられる。

【その 1】 基礎研究の分野において、これまでタマネギが LF を生成する生理的な理由は、細胞が破壊された時に生成することから、動物（ヒトを含めた哺乳類）、微生物、原生生物、昆虫など外敵に対して身を守る役割の一部は果たしているのではないかと推測されてきた。しかし LF を生成しないタマネギが存在しなかったことから、合成した LF などを用いた細菌や真菌への殺菌作用の研究等に限定されており、未だ大部分が未解明である（今井 2011）。今回の作出したタマネギはゲノム上から LF 生成に重要な酵素である alliinase が欠失しており根本的に LF が生成しない。ゆえに、本タマネギを用いることで、タマネギの生育ステージ毎の防御応答機構や、その中での LF の役割を解明する研究が進展する

ことが期待できる。

【その2】 産業応用の面においては、作出したタマネギによる変色現象の抑制効果を検証した。その結果、当初の予想通り、PRENCISOが分解されず変色に関わる物質生成が抑えられたことから、alliinase抑制タマネギでは変色が認められなかった。このタマネギを用いることで、半世紀を越えるタマネギの変色現象による廃棄ロスを根本的に抑制することが可能となる。

【その3】 作出したタマネギは、日本においては2015年より、アメリカでは2020年より一般販売が開始され、生産者、販売者、そして消費者と関係者皆から好評を得ている。生産や販売の場面では、栽培方法の影響を受けず安定して催涙性や辛みがないことを担保できる点や催涙性や辛みが弱いスイートオニオンと呼ばれる品種と比較して本タマネギは長日系品種由来であり貯蔵性が高い点が評価されている。また喫食場面においては、例えばタマネギをスイーツに使用したり、厚切りのままタマネギを生食するなど、タマネギの新しい生食場面を提供することに繋がり、食の可能性の拡大にも寄与している。さらに作出したタマネギの特性は、雄性不稔系統との交配により、メンデルの法則に従い次世代へ遺伝することが確認できた。

以上のことから、作出したalliinase抑制タマネギを育種素材として活用し、より有用な形質を持った品種作出が今後期待できる。



## 第5章 総括

近年の社会課題の一つとして、持続可能な開発目標（SDGs）がある。著者の所属する食品業界においても、SDGs実現に向けて、バリューチェーン全体で食品ロス低減を目指した研究・開発が活発に進められている。また同時に生鮮品から加工品までコモディティー化が進む食分野において、食の新たな可能性を拓ける事も、食品業界の研究者の使命だと考えている。

本研究においては、トマトに次いで世界で第2位の生産量（年間約1億トン）を有するタマネギを研究対象として、① 食品ロス低減を目的とし、タマネギの加工時に予期せず発生する変色現象の解明、② 変色の防止が可能で食の可能性を拓げることができる新たなタマネギ育種素材の開発に取り組んだ。

- 第1章では、本研究の背景について述べた。
- 第2章では、食品ロスの現状、タマネギの変色現象に関する反応機構や構造解析、およびタマネギの育種に関する既往の研究について概説し、本研究の意義や解決すべき課題を明らかとした。
- 第3章では、タマネギのピンキング現象において、新たにCepathiolanesがCDsであることを示すと共に、PPを生成する主要物質であることを明らかにした。またPPとホルムアルデヒドを含むモデル反応系から、無色透明なCC $\alpha$ 、CC $\beta$ 、ピンク色素であるPink Pigment  $\alpha$ 、Pink Pigment  $\beta$ が生成することを明らかとし、それら物質の構造は、2~3分子のPP-Valがホルムアルデヒドを介して架橋された構造をとることを明らかとした。

また上記結果を基に、変色現象の根本的な抑制方法として、alliinaseの働きが

抑制されたタマネギを作出するという解決方法を見出した。alliinase抑制タマネギは、変色現象を抑制するだけでなく、alliinase以降の反応が進まないことから根本的に催涙性や辛みがないタマネギとなり、既存の催涙性や辛みの弱いタマネギの課題である特性の安定性や貯蔵性を改善できる可能性があると考えた。

- 第4章では、長日系の貯蔵が可能な品種に重イオンビーム照射を行い、催涙性や辛みの発現に寄与するalliinase（遺伝子番号1のalliinase）がゲノム上から欠失した2系統のalliinase抑制タマネギの作出に成功した。このタマネギの特性を詳細に解析する中で、タマネギゲノム中に複数存在するalliinase遺伝子のうち、催涙や辛み物質であるLFをはじめ様々な物質生成の起点であるPRENCISOの分解に寄与するalliinaseは、遺伝子番号1のalliinaseであることを明らかにした。

作出したタマネギの産業応用に関して、作出したタマネギによる変色現象の抑制効果を検証した。その結果、当初の予想通り、PRENCISOが分解されず変色に関わる物質生成が抑えられたことから、alliinase抑制タマネギでは変色が認められなかった。このタマネギを用いることで、半世紀を越えるタマネギの変色現象による廃棄ロスを根本的に抑制することが可能となる。また作出したタマネギは、日本においては2015年より、アメリカでは2020年より一般販売が開始され、生産者、販売者、そして消費者と関係者皆から好評を得ている。生産や販売の場面では、栽培方法の影響を受けず安定して催涙性や辛みがないことを担保できる点や催涙性や辛みが弱いスイートオニオンと呼ばれる品種と比較して本タマネギは長日系品種由来であり貯蔵性が高い点が評価されている。また喫食場面においては、例えばタマネギをスイ

ーツに使用したり、厚切りのままタマネギを生食するなど、タマネギの新しい生食場面を提供することに繋がり、食の可能性の拡大にも寄与している。さらに作出したタマネギの特性は、細胞質雄性不稔系統との交配により、メンデルの法則に従い特性が次世代へ遺伝することが確認できた。このことから本タマネギを育種素材として活用し、より有用な形質を持った品種の作出が今後期待できる。

以上のように本研究は、食品ロス低減や食の新たな可能性の拡大に貢献する実学的研究である。今後、このタマネギが広く世の中に広まり、タマネギの食べ方を変え、いつの日か、タマネギの代名詞が「催涙性や辛みから甘さに置き換わる」ことにも期待したい。

## 引用文献

- Anthon, E. G. & Barrett, M. D. (2003). Modified method for the determination of pyruvic acid with dinitrophenylhydrazine in the assessment of onion pungency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1210–1213.
- Aoyagi, M., Kamoi, T., Kato, M., Sasako, H., Tsuge, N. & Imai, S. (2011). Structure and bioactivity of thiosulfates resulting from suppression of lachrymatory factor synthase in onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 10893–10900.
- Arumuganathan, K. & Earle, ED. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 208–218.
- Bai, B., Chen, F., Liao, X., Zhao, G. & Hu, X. (2005). Mechanism of the greening color formation of “Laba” garlic, a traditional homemade Chinese food product. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7103–7107.
- Bai, B., Li, L., Hu, X., Wang, Z. & Zhao, G. (2006). Increase in the permeability of tonoplast of garlic (*Allium sativum*) by monocarboxylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8103–8107.
- Block, E. [Allium Chemistry 101: Historical Highlights, Fascinating Facts and Unusual Uses for Alliums; Kitchen Chemistry] Garlic and other alliums: The lore and the science [76–77] (Royal Society of Chemistry Publishing, Cambridge, UK 2009).
- Block, E., Penn, R. E. & Reville, L. K. (1979). Structure and origin of the onion lachrymatory factor. A microwave study. *Journal of the American Chemical Society*, 101(8), 2200-2201.
- Bottéro, Jean. (1985). The cuisine of ancient Mesopotamia. *The Biblical Archaeologist*, 481, 30-47.
- Brewster, J. L. (2008). Onions and Other Vegetable Alliums. CABI, Oxfordshire, UK.
- Brodnitz, M. H. & Pascale, J, V. (1971). Thiopropanal S-Oxide: a lachrymatory factor in onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(2), 269-272.
- Clark, S. A. (1993). Molecular cloning of a cDNA encoding alliinase from onion (*Allium cepa* L.). Ph.D. thesis University of Canterbury, Christchurch, New Zealand.

- Clemens, R. (2002). Why can't *Vidalia* onions be grown in Iowa? Developing a branded agricultural product. Agricultural marketing resource center, MATRIC Briefing Paper 02-MBP 3, Midwest Agribusiness Trade Research and Information Center, Iowa State University, September.
- Currah, L. & Proctor, J. F. (1990). Onions in tropical regions. Natural Resources Institute, Chatham, UK. Bulletin 35, 31-42.
- Do, G. S., Suzuki, G. & Mukai, Y. (2004). Genomic organization of a novel root alliinase gene, ALL1, in onion. *Gene*, 325, 17–24.
- Dong, Y., Wang, D., Li, M., Hu, X. & Zhao, G. (2010). One new pathway for *Allium* discoloration. *Food Chemistry*, 119, 548–553.
- Eady, C. C., Kamoi, T., Kato, M., Porter, N. G., Davis, S., Shaw, M., Kamoi, A. & Imai, S. (2008). Silencing onion lachrymatory factor synthase causes a significant change in the sulfur secondary metabolite profile. *Plant Physiology*, 147, 2096–2106.
- Eady, C. C., Trueman, L., McCallum, J., Shaw, M., Pither-Joyce, M., Davis, D. & Reader, J. (2005). Transgenic onions with reduced alliinase activity: Biochemical and molecular assessment. *Acta Horticulturae*, 688, 181–188.
- Finkers, R., Kaauwen, M. van, Ament, K., Burger-Meijer K., Egging, R., Huits, H., Kodde, L., Kroon, L., Shigyo, M., Sato, S., Vosman, B., Workum, W, van. & Scholten, O. (2021). Insights from the first genome assembly of Onion (*Allium cepa*). *Genes Genomes Genetics*, 11(9), jkab243, DOI: 10.1093/g3journal/jkab243.
- Flavell, R. B., Bennett, M. D., Smith, J. B. & Smith, D. B. (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics*, 12, 257–269.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT Statistics Database, (2019). Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fritsch R. M. & Keusgen, M. (2006). Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry*, 67, 1127–1135.
- Gilpin, B. J., Leung, D. W. & Lancaster, J. E. (1995). Nucleotide sequence of a nuclear clone of alliinase (accession no. L48614) from onion (PGR 95–125). *Plant Physiology*, 110, 336.
- Havey, M. J. & McCallum, J. (2012). An international plan for sequencing and annotation of onion. <https://haveylab.horticulture.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/66/2016/07/Onion-Sequencing-White-Paper-Final.pdf>

- Imai, S., Akita, K., Tomotake, M. & Sawada, H. (2006a). Identification of two novel pigment precursors and a reddish–purple pigment involved in the blue–green discoloration of onion and garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 843–847.
- Imai, S., Akita, K., Tomotake, M. & Sawada, H. (2006b). Model studies on precursor system generating blue pigment in onion and garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 848–852.
- Imai, S., Tsuge, N., Tomotake, M., Nagatome, Y., Sawada, H., Nagata, T. & Kumagai, H. (2002). An onion enzyme that makes the eyes water. *Nature*, 419, 685.
- Ishikawa, S., Ishimaru, Y., Igura, M., Kuramata, M., Abe, T., Senoura, T., Hase, Y., Arao, T., Nishizawa, N. & Nakanishi, H. (2012). Ion-beam irradiation, gene identification, and marker-assisted breeding in the development of low-cadmium rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 19166–19171.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. (2014). *Compendium of Chemical Terminology Gold Book Version 2.3.3*.  
<https://goldbook.iupac.org/files/pdf/goldbook.pdf>.
- Joslyn, M. A. & Peterson, R. G. (1958). Reddening of white onion bulb purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6, 754–765.
- Joslyn, M. A. & Peterson, R. G. (1960). Reddening of white onion tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 72–76.
- Joslyn, M. A. & Sano, T. (1956). The formation and decomposition of green pigment in crushed garlic tissue. *Journal Food Science*, 21, 170–183.
- Kamata, Y., Masamura, N., Miyazaki, A. & Nagata, T. (2011). A novel autofluorescence-based selection of calli amenable to *Agrobacterium*-mediated transformation in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Biotechnology*, 28, 361–371.
- Kamoi, T. (2008). Developing an optimal method for producing a tearless onion. Ph.D. thesis Lincoln University, Christchurch, New Zealand.
- Kanaya, T., Saito, H., Hayashi, Y., Fukunishi, N., Ryuto, H., Miyazaki, K., Kusumi, T., Abe, T. & Suzuki, K. (2008). Heavy-ion beam-induced sterile mutants of verbena (*Verbena × hybrida*) with an improved flowering habit. *Plant Biotechnology*, 25, 91–96.

- Kazama, Y., Hirano, T., Nishihara, K., Ohbu, S., Shirakawa, Y. & Abe T. (2013). Effect of high-LET Fe-ion beam irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Systems*, 88, 189-197.
- Kazama, Y., Hirano, T., Saito, H., Liu, Y., Ohbu, S., Hayashi, Y. & Abe T. (2011). Characterization of highly efficient heavy-ion mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 11, 161.
- Khosa, J. S., McCallum, J., Dhatt, A. S. & Macknight. R. C. (2016). Enhancing onion breeding using molecular tools. *Plant Breeding*, 135, 9–20.
- Khrustaleva, L., Kirov, I., Romanov, D., Budylin, M., Lapitskaya, I., Kiseleva, A., Fesenko, I. & Karlov, G. (2012). The chromosome organization of genes and some types of extragenic DNA in *Allium*. *Acta Horticulturae*, 969, 43–52.
- King, J. J., Bradeen, J. M., Bark, O., McCallum, J. A. & Havey, M. J. (1998). A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 52–62.
- Kitamura, N., Shimomura, N., Iseki, J., Honma, M., Chiba, S., Tahara, S. & Mizutani, J. (1997). Cysteine-S-conjugate  $\beta$ -lyase activity and pyridoxal phosphate binding site of onion alliin lyase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 1327–1330.
- Kopsel, D. E., Randle, W. M. & Eiteman, M. A. (1999). Changes in the S-alk(en)yl cysteine sulfoxides and their biosynthetic intermediates during onion storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124, 177–183.
- Kubec, R., & Velišek, J. (2007). *Allium* discoloration: The colour-forming potential of individual thiosulfinates and amino acids: Structural requirements for the colour-developing precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3491–3497.
- Kubec, R., Hrbáčková, M., Musah, R. A. & Velišek, J. (2004). *Allium* discoloration: Precursors involved in onion pinking and garlic greening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5089–5094.
- Kuhl, J., Cheung, F., Yuan, Q., Martin, W., Zewdie, Y., McCallum, J., Catanach, A., Rutherford, P., Sink, K., Jenderek, M., Prince, J., Town, C. & Havey, M. (2004). A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. *The Plant Cell Online*, 16, 114-125.

- Lancaster, J. E., Shaw, M. L., Joyce, M. D., McCallum, J. A. & McManus, M. T. (2000). A novel alliinase from onion roots. Biochemical characterization and cDNA cloning. *Plant Physiology*, 122, 1269–1279.
- Lee, E. J., Rezenom, Y. H., Russell, D. H., Patil, B. S. & Yoo, K. S. (2012). Elucidation of chemical structures of pink-red pigments responsible for ‘pinking’ in macerated onion (*Allium cepa* L.) using HPLC-DAD and tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 131, 852–861.
- Lombard, K. A., Geoffriau, E. & Peffley, E.B. (2004). Total quercetin content in onion: survey of cultivars grown at various locations. *HortTechnology*, 14: 628-630.
- Lukes, T. M. (1959). Pinking of onions during dehydration. *Food Technology*, 13, 391–393.
- Lukes, T. M. (1986). Factors governing the greening of garlic puree. *Journal of Food Science*, 51, 1577–1582.
- Martin, W., McCallum, J., Shigyo, M., Jakše1, J., Kuhl, J., Yamane, N., Pither-Joyce, M., Gökçe, A., Sink, K, Town, C. & Havey, M. (2005). Genetic mapping of expressed sequences in onion and in silico comparisons with rice show scant colinearity. *Molecular Genetics and Genomics*, 274, 197-204.
- Masamura N. (2013). Molecular Biology and Biochemical Study of Lachrymatory Factor Synthase in *Allium cepa* L. (onion). Ph.D. thesis University of Tsukuba, Ibaraki, Japan.
- McCallum, J. (2007). Onion. In: C. Kole (ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Volume 5*, 331-342. Springer, Heidelberg, Berlin, New York.
- Miyazaki, K., Suzuki, K., Iwaki, K., Kusumi, T., Abe, T., Yoshida, S. & Fukui, H. (2008). Flower pigment mutations induced by heavy ion beam irradiation in an inter specific hybrid of *Torenia*. *Plant Biotechnology*, 23, 163-167.
- Okamoto, D., Noguchi, Y., Muro, T. & Morishita, M. (2006). Genetic Variation of Quercetin Glucoside Content in Onion (*Allium cepa* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 75, 100-108.
- Randle, W. M. [Spices: Flavor chemistry and antioxidant properties] Onion flavor chemistry and factors influencing flavor intensity [Risch, S. J. & Ho, C. T. (ed.)] [41–52] (American Chemical Society, Washington D. C., USA, 1997).



- Randle, W. M., Block, E., Littlejohn, M. H., Putman, D. & Bussard, M. L. (1994). Onion (*Allium cepa* L.) thiosulfinates respond to increasing sulfur fertility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2085-2088.
- Randle, W. M., Lancaster, J. E., Shaw, M. L., Sutton, K. H., Hay, R. L. & Bussard, M. L. (1995). Quantifying onion flavor compounds responding to sulfur fertility – sulfur increases levels of alk(en)yl cysteine sulfoxides and biosynthetic intermediates. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(6), 1075–1081.
- Ribaut, J.M., Varshney, R.K., Tuberosa, R., Buckler, E.S., Langridge, P. & Rafalski, J.A. (2012). Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nature. Biotechnology*, 30, 1172-1176.
- Ricroch, A., Yockteng, R., Brown, SC. & Nadot, S. (2005). Evolution of genome size across some cultivated *Allium* species. *Genome*, 48, 511–520.
- Shannon, S., Yamaguchi, M. & Howard, F. D. (1967a). Precursors involved in the formation of pink pigments in onion purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 423–426.
- Shannon, S., Yamaguchi, M. & Howard, F. D. (1967b). Reactions involved in formation of a pink pigment in onion purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 15, 417–422.
- Shigyo, M., Tashiro, Y., Isshiki, S. & Miyazaki, S. (1996). Establishment of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A. cepa* L. *Aggregatum* group). *Genes & Genetic Systems*, 71, 363-371.
- Takano, N., Takahashi, Y., Yamamoto, M., Teranishi, M., Yamaguchi, H., Sakamoto, A., Hase, Y., Fujisawa, H., Wu, J., Matsumoto, T., Toki, S. & Hidema, J. (2013). Isolation of a novel UVB-tolerant rice mutant obtained by exposure to carbon-ion beams. *Journal of Radiation Research*, 54, 637-648.
- Tanaka, A., Shikazono, N. & Hase, Y. (2010). Studies on biological effects of ion beams on lethality, molecular nature of mutation, mutation rate, and spectrum of mutation phenotype for mutation breeding in higher plants. *Journal of Radiation Research*, 51, 223-233.
- Van Damme, E. J., Smeets, K., Torrekens, S., Van Leuven, F. & Peumans W. J. (1992). Isolation and characterization of alliinase cDNA clones from garlic (*Allium sativum* L.) and related species. *European Journal of Biochemistry*, 209, 751–757.

Van Heusden, A. W., Shigyo, M., Tashiro, Y., Vrieling-van Ginkel, R. & Kik, C. (2000). AFLP linkage group assignment to the chromosomes of *Allium cepa* L. via monosomic addition lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 480–486.

Van't Hof, J. (1965). Relationships between mitotic cycle duration, S period duration and the average rate of DNA synthesis in the root meristem cells of several plants. *Experimental Cell Research*, 39, 48–58.

今井真介. (2011). タマネギの催涙成分. 中谷延二 監修. スパイス・ハーブの機能と最新応用技術. シーエムシー出版. 151-157.

公益社団法人 日本栄養・食糧学会. (2013). 食品の遊離アミノ酸含量表.  
[https://www.jsnfs.or.jp/database/database\\_aminoacid.html](https://www.jsnfs.or.jp/database/database_aminoacid.html)

国際連合食糧農業機関 (FAO). (2011). Global Food Losses and Food Waste.  
[http://jaicaf.or.jp/fao/publication/shoseki\\_2011\\_1.pdf](http://jaicaf.or.jp/fao/publication/shoseki_2011_1.pdf)

農林水産省. (2019). 野菜の生産・消費動向レポート.  
<https://www.maff.go.jp/j/seisan/ryutu/yasai/attach/pdf/index-67.pdf>

農林水産省. (2022). 食品ロス及びリサイクルをめぐる情勢.  
[https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku\\_loss/attach/pdf/161227\\_4-18.pdf](https://www.maff.go.jp/j/shokusan/recycle/syoku_loss/attach/pdf/161227_4-18.pdf)

## 付記

本論文は下記の誌上、学会発表、並びに特許の内容を中心にまとめたものである。

## 報文

Masahiro Kato, Takahiro Kamoi, Ryosuke Sasaki, Nozomu Sakurai, Koh Aoki, Daisuke Shibata, Shinsuke Imai. Structures and reactions of compounds involved in pink discolouration of onion. *Food Chemistry*, 139 (1-4): 885-892, (2013).

Masahiro Kato, Noriya Masamura, Jinji Shono, Daisaku Okamoto, Tomoko Abe, Shinsuke Imai. Production and Characterization of tearless and non-pungent onion. *Scientific Reports*, 6:23779, DOI: 10.1038/srep23779, (2016).

## 学会発表

加藤 雅博、正村 典也、正野 仁慈、岡本 大作、阿部 知子、今井 真介：涙の出ない、辛みのないタマネギの作出と特性解析. 園芸学会平成27年度春季大会. 千葉. 2015年3月

加藤 雅博、正村 典也、正野 仁慈、岡本 大作、上山 正恵、阿部 知子、今井 真介：涙の出ない、辛みのないタマネギの作出と特性解析. 第30回日本香辛料研究会. 京都. 2015年12月

加藤 雅博、正村 典也、正野 仁慈、岡本 大作、今井 真介：涙の出ない、辛みのないタマネギの作出と特性解析 第二報. 園芸学会平成28年度秋季大会. 愛知. 2016年9月

## 特許

加藤 雅博、正村 典也、上山 正恵：タマネギの判別方法 日本 (特許第6360244号)、中国 (Appln.No. 201880061502.1)、オーストラリア (Reg.No. 2018337373)

加藤 雅博、正野 仁慈、正村 典也、今井 真介、鎌田 庸宏：辛みがなく、催涙成分の生成がないタマネギ 日本 (特許第5671657号)、EU (Reg.No.2992756)、アメリカ (Reg.No.10271500)、中国 (Reg.No.ZL201480024690.2)、ニュージーランド (Reg.No.713186) 、香港 (Reg.No. HK1222296)、マカオ (Reg.No. J/3014)

## 謝辞

本博士論文は、ハウス食品株式会社ならびにハウス食品グループ本社株式会社において、2006年から2015年の10年間で行なわれた研究を纏めたものです。

研究を纏めるにあたり、筑波大学 生命環境系 教授 青柳 秀紀 博士、同大学 同系 教授 渡邊 和男 博士、教授 繁森 英幸 博士、准教授 春原 由香里 博士より懇切なるご指導を頂きました。先生方の多大なるご指導・ご鞭撻に心より、感謝の意を表します。

本研究の実施ならびに執筆の機会を与えて頂きましたハウス食品グループ本社株式会社 研究開発本部長 宮奥 美行 氏に深く感謝申し上げます。研究の実施にあたり、ご指導頂きましたハウス食品グループ本社株式会社 澤田 博 博士（当時）、今井 真介 博士、柘植 信昭 博士、正村 典也 博士に心から感謝申し上げます。皆様にはタマネギを題材に基礎研究から応用研究、そして実用化まで幅広い研究開発の機会を与えて頂きましたことに心から御礼申し上げます。

研究を進める中で日々の議論とご協力を頂きましたハウス食品グループ本社株式会社 鴨井 享宏 博士、青柳 守紘 氏、正野 仁慈 氏（当時）そしてアグリ素材開発部、基礎研究部の皆様に心から感謝申し上げます。

最後に私事ではありますが、これまで温かく見守ってくれた両親、日々支えてくれた妻 みゆきをはじめ家族に感謝し、謝辞と致します。