

pe lg 変異体を用いたトマトのクチクラ層の
特性に関する研究

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

金原 淳司

目次

略語表

序論	1
第1章 トマトにおける <i>sticky peel / light green(pe/lg)</i> 変異体の解析	
1-1 緒言	9
1-2 材料および方法	9
1-3 結果	14
1-4 考察	20
図表	24
第2章 <i>pe/lg</i> 形質の原因遺伝子の単離	
2-1 緒言	41
2-2 材料および方法	41
2-3 結果	46
2-4 考察	50
図表	52
第3章 <i>CD2</i> 遺伝子の変異が果実代謝産物に与える影響	
3-1 緒言	64
3-2 材料および方法	65
3-3 結果	67
3-4 考察	70
図表	73
総合考察	80
謝辞	88
引用文献	89
Appendix: 代謝産物分析条件	101

略語表

ABA: アブシジン酸

ANL: ANTHOCYANINLESS

cd: cutin deficient

Cwp: Cuticular water permeability

DAG: ジアシルグリセロール

dfd: delayed fruit deterioration

DGDG: ジガラクトシルジアシルグリセロール

GC-EI-TOF-MS: gas chromatography-electron ionization-time-of-flight-mass spectrometry

gpat: glycerol-3-phosphate acyltransferase

IL: introgression line

lacs: long-chain acyl-CoA synthetase

lecer: lycopersicum esculentum eceriferum

lg: light green

MSTFA: *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide

MS: Murashige-Skoog

MGDG: モノガラクトシルジアシルグリセロール

ORF: 翻訳領域

PC: フォスファチジルコリン

PCA: 主成分分析

pe: sticky peel

PE: フォスファチジルエタノールアミン

PG: フォスファチジルグリセロール

PI: フォスファチジルイノシトール

PPFD: 光合成光量子束密度

SEM: 走査型電子顕微鏡

SGN: Sol Genomics Network

SQDG: スルフォキノボシルジアシルグリセロール

TB: トルイジンブルー

TEM: 透過型電子顕微鏡

TIC: total ion chromatograms

UGA: unidentified glycoalkaloid

序論

トマトは FAO 統計 (FAOSTAT 2013) によれば世界で約 1 億 6 千万トン生産されており、野菜の中では、もっとも生産量の多い品目である。また、総務省の統計 (総務省「家計調査」) によれば、日本においても生鮮用トマトは世帯あたり年間約 6,000 円購入されており、野菜の中で最も人気のある品目である。加えて、本来広く認知されていた機能性成分であるリコピン (Rao et al, 2006) に加え、新たに機能性成分 13-オキソ-9,11-オクタデカジエン酸 (Kim et al, 2012) が近年注目を集めており、トマトの消費量は更に大きく伸びている。このように、トマトは重要な園芸作物であるため、世界各地で栽培されており、またそれぞれの地域に適した様々な栽培形態が存在する。

トマトの栽培形態は、栽培場所が温室か露地かで大きく二分される (Muños et al, 2008)。温室では長期栽培か否かで更に二分される。温室栽培は、収穫期間が長く、ある程度環境を制御することが可能なため、品質が安定するという利点がある。一方、価格は露地栽培よりも高くなるため、栽培されているエリアは世界的に限られている。特に長期栽培を行う温室では、オランダで開発された高軒高のフェンロー温室をベースとした高度な栽培体系が開発されており、温室内環境を精密に管理することによって、1 作で 6-10 か月間収穫が可能となっている (Heuvelink, 2005)。一方、露地栽培は、主に乾燥した気候下で行われる。温室栽培のトマトが全て生鮮用であるのに対し、露地栽培トマトでは生鮮用、加工用 (あるいは両方) という用途が存在し、前者は味や形が重要視される (Bai and Lindhout, 2007) 一方、後者は粘度、糖度、果実硬度などの要素が重要視される (Thakur et al, 1996)。このため、温室か、露地かによって品種に求められる特性が異なることに加え、生鮮、加工

という用途によっても品種に求められる特性は変わってくる。このような多様化したニーズを実現するため、多くの種苗会社がトマトの品種開発に参入している。前述したように、トマトは園芸作物の中で最も人気が高い品目であるため、種苗業界においても、品種開発の競争が激しい品目である(Foolad, 2007)。当初、トマトの品種開発は、アメリカを中心として病虫害抵抗性の導入(Stevens and Rick, 1986)からはじまり、次いで環境ストレス耐性や高品質性といった重要形質の導入が試みられた。その結果、今日までにトマトでは多くの有用形質が近縁野生種等から導入されている(Foolad, 2007)。

果実の表皮を覆っているクチクラ層は、近年これらの重要な形質の機能に深くかかわっていることが報告されている(Yeats and Rose, 2013)。一方で、その特性については、植物種や、組織、環境条件、更には品種間によって異なるため、完全に明らかになっているわけではない。そこで、重要な園芸作物であるトマトを材料として、育種上重要なクチクラ層の特性を解明することを、本研究のテーマとした。

クチクラ層は、表皮細胞の厚い一次細胞壁の外側に構成される脂質の膜である。クチクラ層は、クチンモノマーが重合したクチンと、その間隙を埋めるワックスで構成されている。クチクラ層は極めて薄く、葉においては $0.1\mu\text{m}$ 以下である(Kosma et al, 2009)。一方、トマトの果実には厚いクチクラ層が形成されており、その厚みは $10\mu\text{m}$ を超える(Bargel and Neinhuis, 2005)。クチンの主要な構成要素は、炭素数 16~24 の直鎖脂肪酸、炭素数が 16 あるいは 18 の ω -ヒドロキシ脂肪酸、 α -、 ω -ジカルボン酸、10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸である(Pollard et al, 2008)。興味深いことに、組織によってその量、組成が異なっており、シロイヌナズナでは、葉および茎のクチンモノマーの 70% 以上が α -、 ω -ジカルボン酸であるのに対し、花では 56% が 10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸、29% が α -、 ω -ジカルボン酸である(Li-Beisson et al, 2010)。一方、トマト

では、葉および果実で 10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸が大部分を占めることが報告されている(Nadakuduti et al, 2012)。クチンモノマーの主要な要素である 10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸は、炭素数 16 の脂肪酸であるパルミチン酸がシトクロム P450 (CYP86A4, CYP77A6)に相次いでヒドロキシル化された後、GPAT (Glycerol-3-phosphate sn-2-Acyltransferase) 6 によってアシル基を付加され、10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸グリセロールとなる(Li-Beisson et al, 2009)。その後、10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸グリセロールは、細胞膜に局在する ATP-binding cassette(ABC)トランスポーターABCG11 (McFarlane et al, 2010), ABGC13 (Panikashvili et al, 2011), ABCG32 (Bessire et al, 2011) を経由して細胞壁を通過し、植物体表面に移動すると考えられている。その後、10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸グリセロールはアシル基転移酵素である CD1 によって重合化され、クチンとなる(Girard et al, 2012; Yeats et al, 2012)。

一方、ワックスは主に炭素数が 22 以上の脂肪酸、アルデヒド、1 級アルコール、アルカン、2 級アルコール、ケトンから構成され、シロイヌナズナの葉では、約 75%が直鎖のアルカンである(Lu et al, 2009)。同様にトマトの葉および果実においても、最も多い構成要素はアルカンである(Vogg et al, 2004; Isaacson et al, 2009)。ワックスはクチンと同じパルミチン酸(炭素数 16)、それに加えてステアリン酸(炭素数 18)から合成される。まず、これらの脂肪酸を基質として、小胞体内で ketoacyl-CoA synthase (KCS), ketoacyl-CoA reductase (KCR), hydroxyacyl-CoA dehydrase(HACD), enoyl-CoA reductase(ECR)といった酵素によって、炭素鎖の伸長反応がなされ、長鎖飽和脂肪酸アシル CoA が合成される。その後、還元酵素、脱水素酵素、脱カルボニル化酵素等の修飾を受け、クチンと同様に ABCトランスポーターABCG11 を経由して表皮に移動すると考えられている(Samuels et al, 2008; Li-Beisson et al, 2010)。

ワックスはクチンのように重合することはないため、細胞内で完成した代謝産物が、そのままクチクラ層へロードされる。

クチクラ層は、植物が陸上の環境に適応するために獲得した組織であり、最も重要な機能は、余剰な蒸散を防ぐことである (Gaff and Oliver, 2013)。このため、クチクラ層の生合成に関与する遺伝子の欠損、変異体は、蒸散量が大きく上昇することが知られている。このことを利用して、外部の水が浸透する程度でクチクラ層の変異をスクリーニングする方法も開発されている (Tanaka et al, 2004)。水の透過を防ぐ機能は、主にワックスによって実現されていると考えられている。実際、トマトではクチンの量と果実の蒸散量に明確な相関関係が見られない (Isaacson et al, 2009) ことに加え、トウガラシにおいては、果実の蒸散量に差のある遺伝資源の解析をした結果、クチンモノマーの組成、量には明確な相関は見られなかった一方、主要なワックス成分であるアルカンの総量と、果実の蒸散量は強い負の相関関係があることが明らかになっている (Parsons et al, 2012)。

害虫、病原菌が最初に接触する植物組織であることから、クチクラ層は病害抵抗性にも深く関与している (Reina-Pinto and Yephremov, 2009)。実際、トマトのクチクラ層変異体である *cutin deficient (cd) 1, cd2, cd3* では、果実に病原菌 *Botrytis cinerea* を接種すると、野生型系統よりも、高い頻度で感染が成立することが報告されている (Isaacson et al, 2009)。また、シロイヌナズナの *att1* 変異体、*lacs2* 変異体は、本来シロイヌナズナが感染しないはずの病原菌 *Pseudomonas syringae* に感染することが報告されている (Xiao et al, 2004; Tang et al, 2007)。同様に、*gpat4/8* 遺伝子を抑制した系統では、*Alternaria brassicicola* への感受性が増大することも報告されている (Li et al, 2007)。

これとは逆に、アブシジン酸アルデヒドオキシダーゼに変異を有するトマトの *sitiens* 変異体 (Harrison et al, 2011) では、クチクラ層が部分的に

欠損しているにもかかわらず、病原菌 *Botrytis cinerea* への抵抗性が高まることが報告されている (Curvers et al, 2010)。興味深いことに類似の現象は、前述のシロイヌナズナの *att1* 変異体 (Xiao et al, 2004)、*lacs2* 変異体 (Bessire et al, 2007; Tang et al, 2007)、その他に *lcr* 変異体 (Wellesen et al, 2001)、*bdg* 変異体 (Kurdyukov et al, 2006) においても報告されている。これらの変異体に共通していることは、クチクラ層の機能が欠損し、その結果クチクラ層の透過性が上昇することである。このことは一見すると病害抵抗性を低下させるようにみえる。しかし実際は、これらのことは植物体が常にストレスを感知している状態になっており、抵抗性反応が常時誘導されていることを示唆している。実際にトマトの *sitiens* 変異体では、病虫害ストレスで誘導される遺伝子群が常時発現しており、病原菌が感染した際、速やかに抵抗性反応が誘導されると考えられている (Asselbergh et al, 2007)。このため *sitiens* 変異体では、病原菌は、植物体の表皮細胞付近にとどまり、感染を拡大できないことが確認されている (Curvers et al, 2010)。また、分解されたクチンモノマーが植物の抵抗性反応を誘導するという報告がある (Kauss et al, 2009) 他、病原菌 *Fusarium Solani* が有するクチン分解酵素クチナーゼを植物に導入すると、病原菌 *Botrytis cinerea* に極めて強い抵抗性を有することが明らかになっている (Sieber et al, 2000; Chassot et al, 2007)。このように、クチクラ層は、病害抵抗性に深く関与していることは明らかであるものの、その機構については病原菌側との相互作用も含め、解明されていない点が多い。

水の透過性、病虫害抵抗性に加えて、トマト果実においては、裂果性、日持ち性、食感、外観、機能性成分蓄積といった育種上重要な形質にクチクラ層の特性が関与していることが報告されている。裂果抵抗性については、クチクラ層の強度が重要であり、クチクラ層の強度はその厚さと正の相関があるという報告がある (Matas et al, 2004)。一方、トマトの

近縁野生種 *Solanum habrochaites* から見出された *Cuticular water permeability 1^{hir}* (*Cwp1^{hir}*) 遺伝子を有する系統は、クチクラ層に細かい亀裂が入るという表現型を示す (Hovav et al, 2007)。それ以外にも、裂果抵抗性は多くの研究がなされており、その複雑な遺伝様式にもかかわらず、既に多くの実用品種が開発されている (Stevens and Rick, 1986)。日持ち性については *Delayed Fruit Deterioration (DFD)* 変異体、*cd1*, *cd2*, *cd3* 変異体を用いた解析から、クチクラ層の厚さ、物理的強度が重要であることが示されている。(Saladié et al, 2007; Isaacson et al, 2009)。特に *DFD* 変異体は、果実の成熟は正常に進行するものの、成熟後の軟化が進まず、極めて長い日持ち性を示す (Saladié et al, 2005)。*DFD* 変異体の果実におけるワックスの総量は、野生型品種の約 1.3 倍、クチンの総量は 2 倍に上る (Saladié et al, 2007)。*DFD* 変異体の原因遺伝子は明らかになっていないものの、これらの結果から、クチクラ層の特性が直接的あるいは間接的に果実の日持ち性に寄与していると考えられている。

食感については、遺伝学的な解析は少ないものの、咀嚼した後の果皮の残り具合について、QTL 解析がなされている (Causse et al, 2002)。果皮の残り具合は、その他の食味関連形質との相関解析が行われ、その結果、果実の硬さと強い相関があることが明らかにされている (Chaib et al, 2007)。一般的な嗜好性としては、果皮は残らずに果実は柔らかいほうが好ましいとされるものの、これらの特性は日持ち性の観点からは相容れないため、双方のバランスが重要である。

また、植物の表皮には、フラボノイドが蓄積することが知られている (Hrazdina et al, 1982)。トマト果実では、特に果皮に多くのフラボノイドが蓄積されることが報告されている (Stewart et al, 2000)。フラボノイド生合成とクチン、ワックスの生合成は互いに独立であるが、近年、シロイヌナズナの *anthocyaninless (anl) 2* 変異体 (Kubo et al, 1999)、トマトの *sticky*

peel 変異体 (Nadakuduti et al, 2012) において、表皮とアントシアニンの蓄積の関連が報告されており、相互作用の存在が示唆されている。

フラボノイドはシキミ酸経路で合成される一群の代謝産物であり、*p* クロマイル CoA からカルコンシンターゼ (CHS) の作用によってナリンゲニンカルコンが合成され、次いでカルコンイソメラーゼの作用によってナリンゲニンが合成される (Falcone Ferreyra et al, 2012)。UV 域の波長を吸収する特性から、フラボノイドは紫外線による障害を緩和するために存在すると考えられており、実際にフラボノイドは表皮細胞付近に多く局在する (Winkel-Shirley, 2002)。また、フラボノイドは、植物体内で多様な機能を有していると考えられており、UV からの保護機能以外にも病害抵抗性、花粉管伸長、種皮の発達に関与していることが示されている (Harborne, 1994)。

同時にフラボノイドは、動物に対しても多様な機能性を有している。これまでに動脈硬化防止、消炎、抗癌、抗血栓、骨粗鬆症抑止、抗ウイルスといった作用の存在が示唆されている (Nijveldt et al, 2001)。それゆえに、フラボノイド類のうち、ケルセチンやケンフェロールといったフラボノールだけでなく、アントシアニンについても、既に生合成経路が解明されている他、遺伝子組換えによって、これらの成分を向上させた野菜の開発が試みられている。特に、トマトは、フラボノール、アントシアニンを多く含む遺伝子組換え体の開発が成功しており、社会的にも大きなインパクトを与えている (Muir et al, 2001; Butelli et al, 2008)。興味深いことに、アントシアニンを多く含む遺伝子組換えトマトは、同時に日持ち性や病害抵抗性が向上することも報告されている (Zhang et al, 2013)。

本研究の第 1 章では、多くの重要形質と関係のあるトマトのクチクラ層の特性を解明することを目的として、表皮に関する変異体として知られていた *sticky peel light green (pe lg)* 変異体の組織学的、生理学的解析を行った。その結果、*pe lg* 変異体は果実だけでなく、葉のクチクラ層に

も変異が起こっており、果実および葉のクチクラ層の厚さが薄くなる上、水分透過性が向上していることがわかった。次いで第 2 章では *pe lg* 変異体の遺伝学的解析を行い、候補遺伝子の同定を行った。ファインマッピングおよび候補遺伝子探索の結果、第 1 染色体長腕の *CD2* 遺伝子におけるフレームシフト変異が *pe lg* 形質の原因であるという結論に至った。実際に *CD2* 遺伝子の発現を抑制することで、*pe lg* 形質が再現されることも明らかになった。*cd2* 変異体におけるクチクラ層の欠損は、クチクラ層以外の組織においても、代謝産物の量、組成に大きな変化を引き起こす可能性がある。このことを検証するため、第 3 章ではトマト果実を供試してメタボライトプロファイリングを行った。その結果、*pe lg* 変異体の果実では、ガラクト脂質、リン脂質といった脂質、フラボノイド、グリコアルカロイド、糖関連の代謝産物の組成に大きな変化がみられた。最後に、総合考察では本研究で得られた知見とこれまでの知見をまとめた上で、クチクラ層の特性に着目することで、トマト品種の食味、日持ち性、機能性成分を向上させる可能性について考察した。

第1章 トマトにおける *sticky peel* / *light green* (*pe/lg*) 変異体の解析

1-1 緒言

本章では新規クチクラ層関連変異体 *sticky peel* (*pe*)の表現型を解析した結果を報告する。*pe* 変異体は 1938 年に米国で発見された変異体であり(Young, 1941)、果実は極めて柔らかく、果皮はツヤがあり、薄く伸縮性に富んでおり、裂果に対して抵抗性である(Ho and Hewitt, 1986)。このため、*pe* 変異体の果実はサクランボのような見た目をしている。この特徴から、*pe* 変異体はクチクラ層形成過程に変異が生じている可能性が示唆されている。一方、*pe* と連鎖すると報告されている *light green* (*lg*)は葉の色が淡緑色になる変異体である(Kerr, 1982)。過去の文献では *pe* と *lg* は別個の単因子劣性遺伝子とされているが(Butler, 1952)、本研究で得られた結果では、両遺伝子はその分離が確認できず、*pe* と *lg* は密接に連鎖していることが明らかになった。組織学的、生理学的解析によって、*pe lg* 変異体は果実および葉において、クチクラ層に変異があり、水分透過性が上昇している特徴を持つことが明らかになった。

1-2 材料および方法

植物材料

pe lg 変異体の表現型を調査するため、両変異を LA0759 (Tomato Genetic Resource Center, USA)より導入した系統 KGM942 を材料に用いた。分離比を解析するための F₂ 分離集団の種子は KGM942(*pe/pe*, *lg/lg*)と野生型系統レジナ(*PE/PE*, *LG/LG*, Sakata seeds, Japan)との交配した F₁ 系統を自家受粉させることで取得した。他の野生型系統 K091, RC17, Ec-1 は *pe lg* 変異体のクチクラ層の表現型を比較するために材

料として用いた。これらの 3 系統は全て *PE/PE*, *LG/LG* である他、K091 は果皮のナリンゲニンカルコンが欠失することで果皮の色が透明になる *y* 変異を有している (Adato et al, 2009; Ballester et al, 2010)。

簡易走査型電子顕微鏡 (SEM)、光学顕微鏡による観察

赤熟果の果皮断面観察用サンプルは果実を剃刀で水平に薄くスライスして作成した。サンプルは生のまま、SEM (TM-1000, Hitachi High-technologies, Japan) を用いて 500 倍で観察を行った。クチクラ層の観察は、既報の文献 (Buda et al, 2009) に基づき、Sudan IV で染色を行った後、光学顕微鏡で観察を行った。葉の表面の観察のため、4~5 番目に展開した葉を採取し、1 cm 四方に切り取り、SEM を用いて 1,000 倍で観察を行った。この実験では、RC17 を野生型の対照として用いた。

透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

10~13 番目に展開した葉を氷上で Solution A (2 % パラホルムアルデヒド、2 % グルタルアルデヒド、20 mM リン酸ナトリウム、pH 7.0) に浸漬し、前固定を行った。葉はリン酸ナトリウム溶液 (50 mM, pH 7.0) で 1 時間洗浄した。後固定は 2 % 四酸化オスミウム入りリン酸ナトリウム溶液 (50 mM, pH 7.0) を用いて、氷上で 3 時間行った。脱水は、一連のエタノール溶液 (30 %x1, 50 %x1, 70 %x1, 80 %x1, 90 %x1, 95 %x1, 100 %x3) にサンプルを 30 分間浸漬することで行った。次いで酸化プロピレン中で 30 分間、酸化プロピレンとエポキシ樹脂中で 1 時間置換を行った。サンプルはゼラチンカプセルに包埋し、Quetol651 エポキシ樹脂中で 60 °C、2 日間インキュベートした。次いで Leica-UCT ウルトラマイクロトームで 60-80 nm の切片を切り出した。切片は 200 メッシュの銅グリッドにマウントされ、2 % 酢酸ウラニルで 5 分間染色され、次いで lead

staining solution 中で 5 分間インキュベートされた。TEM による観察は JEM1200EX(Jeol, Japan)にて、80 kV で行った。

クロロフィル含量測定

クロロフィル含量の測定は Porra et al (1989)の方法に従った。16 時間明期、8 時間暗期の条件で栽培した植物体の 5 番目に展開した葉を、5 個体からサンプリングした。葉は 3 ml の *N,N*-ジメチルホルムアミドに 4 °C、一晩浸漬させた。次いで各サンプルの 664 nm, 647 nm における吸光度を測定し、以下の換算式を用いてクロロフィル含量を算出した。

$$\text{Total micrograms of chlorophyll } a = 12.00 * \text{Abs}_{664} - 3.11 * \text{Abs}_{647}$$

$$\text{Total micrograms of chlorophyll } b = 20.78 * \text{Abs}_{647} - 4.88 * \text{Abs}_{664}$$

トルイジンブルー(TB)テスト

植物体表面の水分透過性を調査するため、Tanaka et al (2004)の方法に従って TB テストを行った。サンプルとして、2~3 番目に展開した葉、緑熟果を用いた。この実験では、RC17 を野生型の対照として用いた。

蒸散量測定

葉の表面の水の透過性を調査するため、蒸散量を測定した。発芽後 80 日経過した植物体の 10~15 番目に展開している葉を 5 枚採取した。クチクラ蒸散のみを評価するため、サンプリングの 1 時間前に 500 mg/L のアブシジン酸(ABA)を葉に噴霧して気孔を閉口させた(Freitas et al, 2011)。サンプリング後、葉は 25 °Cの暗室に静置した(Wilkinson et al, 1998)。ABA 処理した葉は実体顕微鏡(SZX7, Olympus, Japan)を用いて、気孔が閉じていることを確認した。蒸散量の測定は 1 時間ごとに、4 回にわたって新鮮重の推移を調査することにより行った。測定終了後、すべての葉を 80°Cのオーブンで乾燥させ、乾物重を測定した。同

様に果実表面の水分透過性を調査するため、赤熟果を 5 個サンプリングし、40 °C で 6 日間インキュベートした。期間中、1, 2, 6 日後の果重を測定するとともに、オーブンでサンプルを乾燥させ、乾物重量を測定した。*pe lg* 変異体として KGM942, 野生型系統として K091, RC17, Ec-1 を用いた。

気孔およびトライコームの密度測定

気孔とトライコームの密度を算出するため、SEM を用いて 5 番目に展開した葉を観察した。0.23 mm² のイメージをトリミングし、枠内に存在する気孔あるいはトライコームの数を計測した。観察は葉の裏面、表面について実施した。

クロロフィル溶出試験

クチクラ層関連の変異体は、通常表皮の保護機能が低下している表現型を示す。この機能不全はクロロフィル溶出試験で簡易的に評価が可能である (Lolle et al, 1998)。このため、Lolle et al (1997) の方法に従い、*pe lg* 変異体に対してクロロフィル溶出試験を行った。サンプルとして 16 時間明期、8 時間暗期の条件で栽培した植物体の 4~5 番目に展開している葉を 5 枚採取した (およそ 0.2g)。完全な葉を 30 ml の 80 % エタノールに浸漬し、8 時間、37 °C で振とうした (200 rpm)。この期間中、1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 時間経過時に、400 µl の上清を採取し、664 nm, 647 nm の吸光度を測定した。測定した吸光度より、溶出したクロロフィル量を以下の換算式で算出した (Hiscox and Israelstam, 1979)。

$$\text{Total micromoles of chlorophyll per gram} = 7.93 * \text{Abs}_{664} + 19.53 * \text{Abs}_{647}$$

ナリンゲニンおよびナリンゲニンカルコン測定

ナリンゲニンおよびナリンゲニンカルコンは Kraus and Galensa (1992)の方法に基づいて行った。検出は L7420 UV-VIS detector (Hitachi, Japan)と SUMIPAX ODS-D-05-4615(SCAS, Japan)を用いて行った。

ワックスおよびクチン画分のメタボライトフィンガープリンティング

ワックスおよびクチンモノマーのメタボライトフィンガープリンティングは、Adato et al (2009)の方法を一部改変して実施した。*pe lg* 変異体の果皮はペクチナーゼ酵素による剥皮が不可能であったため、果実を煮沸して果皮を単離した。供試したのは *pe lg* 変異体 KGM942 と野生型系統 K091, RC17, Ec-1 である。クロロホルムに可溶のワックス画分を取得するため、サンプルあたり約 20 mg の果皮を 5 ml のバイアルに入れ、2 ml のクロロホルムに室温、1 時間浸漬して抽出を 3 回行った。抽出液は一つにまとめた後、0.9 μg の *n*-heptacosane を加え、終濃度 15 ng/ μl の内部標準とした。分析は gas chromatography-electron ionization-time-of-flight-mass spectrometry (GC-EI-TOF-MS)を用いて行った。抽出液は窒素ガス下で乾燥させ、1 ml のクロロホルムに再度溶解させて、200 μl (果皮 5mg 分)を *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA)で誘導体化した後、分析を行った。

ワックス抽出の後、残った果皮に 1.8 μg の *n*-heptacosane を内部標準として添加した。その後、1 ml の 10 % Boron trifluoride-methanol 液を添加して、70 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベートし、クチンを脱重合させた。バイアルを室温まで冷却した後、1 ml の超純水を添加した。その後、ジエチルエーテルを用いたクチンモノマーの抽出を 3 回実施した。抽出液は、窒素ガス下で乾燥させ、1 ml のクロロホルムに再度溶解させて、100 μl (果皮 2 mg 分)を MSTFA で誘導体化させ、GC-EI-TOF-MS で分析を行った。

MSTFA による誘導体化は、溶解液を窒素ガス下で乾燥させた後、30 μl の MSTFA を含むピリジンを添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間インキュベートし、トリメチルシリル基を付加することで行った。分析は Kusano らの方法 (2007b) の通り行った。クロマトグラムは HAD 法 (Jonsson et al, 2006) によって前処理され、各ピークエリアの normalized response は一定濃度の内部標準によって補正した。クチン、ワックスの構成要素の推定は、Kusano の記述 (2007a) の通り、マスフラグメントパターン、相当するリテンションインデックスを NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST08), Golm Metabolome Database, カスタムライブラリ (Stein et al, 1999; Kopla et al, 2005) と比較することによって行った。

統計解析

統計解析はフリーソフトウェア R を用いて行った。群間の平均値の比較は、分散分析 (ANOVA) 後、Tukey HSD にて多重比較 ($p < 0.05$) を行った。数値データは平均値および標準偏差 (SD) を示した。

1-3 結果

pe 形質と *lg* 形質の連鎖

これまでに *pe* 形質と *lg* 形質は分離する、という報告がなされていた。このことを検証するため、KGM942 (*pe lg*) とレジナ (野生型) との交配から得られた F_2 分離集団を 334 個体栽培し、表現型の分離を観察した。この結果、252 個体は野生型の表現型を示した一方、82 個体が *pe* および *lg* の表現型を示した。このことから、*pe* と *lg* は密接に連鎖していることが明らかになった。分離比は野生型 : *pe lg* = 3.07:1 であり、*pe lg* は単因子劣性であることが示唆された (Table 1)。

加えて、予備実験では、1,000 個体以上の F_2 個体を調査した結果、*pe* と *lg* が分離した個体は一つも得られなかった。このため、今回得られた

結果は、*pe* と *lg* が独立した単因子劣性遺伝子であるというこれまでの知見と一致しなかった。このため、以降の解析では *pe* および *lg* の 2 重変異体を解析に用いることにした。最初に、*pe* および *lg* の 2 重変異体の表現型を解析することにした。*pe lg* 変異体の遺伝的背景については、どの文献にも言及はなかった。このため、比較的類似した特性を有する野生型の系統として、K091, RC17, Ec-1 を解析に用いることにした。*pe lg* 変異は葉、果実の新鮮重、大きさには影響を与えない一方で、遺伝的背景の違いがこれらの特性に影響を与えていることが示唆された (Fig.1)。なお、*pe lg* 変異体では、他のクチクラ層変異体で見られる器官同士の癒合や、不稔といった表現型は見られなかった。

***pe lg* 変異体における表皮構造の異常**

pe lg 変異体の果実表皮は野生型と比較すると光沢、ツヤがあり、高い伸縮性を有している (Fig. 2a, b)。加えて、*pe lg* 変異体の果皮では、野生型のトマトにみられる黄色い色素が欠失していた (Fig. 2c, d)。この観察結果から、果皮に蓄積するフラボノイド、ナリンゲニンカルコンが *pe lg* 変異体で欠損していると推察した。そこで、*pe lg* 変異体、および今回供試した野生型の 3 系統の果皮のナリンゲニン含量を測定した。野生型系統のうち、K091 は果皮のナリンゲニン、ナリンゲニンカルコンが減少する *y* 変異を有する。果皮のナリンゲニンの含量を測定した結果、*pe lg* 変異体のナリンゲニン含量は野生型系統 (RC17, Ec-1) よりも有意に低い一方、*y* 変異を有する K091 と近いレベルの含量を示した (Fig. 3)。このことから、果皮のフラボノイド蓄積は、*pe lg* 変異に影響を受けることが明らかになった。

果実表皮の違いが、表皮の細胞層に起因するものか調査するため、SEM を用いて果皮表面の観察を行った (Fig. 2e, f)。野生型系統の果皮表面は平滑になっている一方 (Fig. 2e)、*pe lg* 変異体の果実では、表皮

細胞の構造が透けて見えていた (Fig. 2f)。次いで、果皮の断面を観察した。野生型系統では、表皮細胞はクチクラ層に囲まれていた (Fig. 2g, arrowhead)。一方、*pe lg* 変異体では、果実の表皮は表皮細胞しか見られず、野生型系統で見られたクチクラ層様の構造は見られなかった (Fig. 2h, arrowhead)。クチクラ層の厚みを調査するため、SudanIV によってクチクラ層を染色し、光学顕微鏡を用いて果皮断面の観察を行った。野生型系統の果皮断面では、赤く染色されたクチクラ層が、表皮細胞の上に存在していた (Fig. 2i, arrow)。一方、*pe lg* 変異体では、クチクラ層は著しく薄くなっており (Fig. 2j, arrow)、クチクラ層を構成する要素が大幅に減少していることが示唆された。

次に *lg* 変異の葉における影響を調査するため、野生型系統 RC17 と *pe lg* 変異体の葉の表面を観察した (Fig. 4)。*pe lg* 変異体の葉の色は、野生型系統を比較して、淡緑色をしていた (Fig. 4a, b)。このため、*pe lg* 変異体では、クロロフィル含量が減少していることが示唆された。このことを検証するため、野生型系統と *pe lg* 変異体のクロロフィル含量を測定した。しかしながら、クロロフィル *a* の量は、*pe lg* 変異体と野生型系統 K091, RC17 で有意差が無かった上、クロロフィル *b* は野生型系統よりも *pe lg* 変異体のほうが有意に高い、という結果が得られた (Fig. 5)。この結果から、*pe lg* 変異体の葉の淡緑色は、クロロフィル含量の減少によるものではないことが明らかになった。

次に、SEM を用いて葉の表面の観察を行い、*pe lg* 変異体における表皮構造の変化の有無を調査した。野生型系統の孔辺細胞は、半月状の形状をしていた (Fig. 4c)。一方、*pe lg* 変異体の孔辺細胞は、三日月状の形状をしていた (Fig. 4d)。加えて、*pe lg* 変異体では、表皮細胞がゆがんでいるように観察された (Fig. 4d)。

このことを更に調べるため、葉の切片を作成し、光学顕微鏡と TEM による観察を行った。光学顕微鏡による観察では、野生型の 3 系統 (Fig.

6a-c)と *pe lg* 変異体 (Fig. 6d)には表皮の構造上の違いは見られなかった。野生型系統および *pe lg* 変異体では、葉は上面から表皮、柵状葉肉組織、海綿状葉肉組織、下面の表皮から構成されていた。TEM によって葉の表側の断面を観察したところ、野生型の 3 系統、*pe lg* 変異体では電子密度の薄い cuticle proper (Fig. 6e-h, 黒矢印) および電子密度の濃いクチクラ層 (Fig. 6e-h, 白矢印) が観察された。興味深いことに、野生型系統を比較して、*pe lg* 変異体のクチクラ層は明らかに電子密度が薄かった (Fig. 6h)。対照的に、葉の裏側の断面では、野生型系統と *pe lg* 変異体の間で、クチクラ層及び cuticle proper の電子密度に違いは見られなかった (Fig. 6i-l)。

pe lg 変異体における水の透過性

一般的にシロイヌナズナでクチクラ層が薄くなる変異体は、特に葉の水分透過性が上昇することが知られている。もし *pe lg* 変異体のクチクラ層が薄い、あるいは欠損しているのであれば、葉の水分透過性が上昇していることが予想される。そこで、表皮の形成不全による水分透過性の変化を評価するトルイジンブルー (TB) テストを行った。この実験では 5 番目に展開した葉と緑熟の果実を 5 分間 TB 溶液に浸漬し、染色される度合いを評価した。葉の裏側は、野生型系統、*pe lg* 変異体双方とも同様に染色された。しかし、葉の表側は野生型系統が全く染色されなかった (Fig. 7a)。その一方で、*pe lg* 変異体は速やかに TB で染色された (Fig. 7b)。同様に、野生型系統の果実は TB で全く染色されなかったが (Fig. 7c)、*pe lg* 変異体の果実は、スポット状に TB によって染色された (Fig. 7d)。果皮断面を観察したところ、TB は表皮から果実組織内部へ浸透していることが明らかになった (Fig. 7e)。

蒸散量の測定

葉のクチクラ層の欠損は、蒸散量の増大を招くことが知られているため、*pe lg* 変異体の葉の蒸散量について同様に調査を行った。想定通り、*pe lg* 変異体の蒸散量は野生型の 3 系統よりも有意に多かった (Fig. 8)。次に、*pe lg* 変異体の薄くなった果皮が、水分透過性に与える影響を評価するため、果実の蒸散量についても測定を行った。想定に反して、*pe lg* 変異体の果実は、野生型系統 K091, RC17 よりも低い蒸散量を示した (Fig. 9a)。果実を 6 日間インキュベートした結果、K091 と RC17 の果実は水分を失ったため、表皮にしわが確認された (Fig. 9b)。一方、KGM942 と Ec-1 は同じ条件でインキュベートしたものの、外観はほぼ実験開始時と同じであった (Fig. 9b)。また、乾物重量は野生型系統と *pe lg* 変異体で差異は見られなかった (Fig. 10)。果実における水分透過性、蒸散量の特性は一見矛盾しており、そのメカニズムについては更に解析が必要である。

一方、葉においては、水分透過性、蒸散量がともに *pe lg* 変異体では野生型系統より高く、既存のクチクラ層変異体の表現型と類似していることが明らかになった。葉における蒸散量の増大は、表面構造、特に気孔やトライコーム密度の変化に起因する可能性が考えられたため、葉の表・裏面における気孔およびトライコームの密度を計測した (Fig. 11, Fig. 12)。遺伝的な背景の影響を受けるものの、*pe lg* 変異体は野生型系統 K091 と RC17 よりも葉の表側の気孔密度が低かった (Fig. 11)。一方、葉の裏側の気孔密度については、*pe lg* 変異体と野生型系統 RC17、Ec-1 との間で差異は見られなかった (Fig. 11)。トライコームの密度は、野生型の 3 系統、*pe lg* 変異体の間で、葉の表・裏面ともに差異は見られなかった (Fig. 12)。このことから、*pe lg* 変異体における蒸散量の増大は、気孔の数が多いことに起因するのではなく、クチクラ層を通したクチクラ蒸散の増大が原因であることが明らかになった。

クロロフィル溶出試験

更にクチクラ層の特性を調査するため、クロロフィル溶出試験を実施した。この試験は、葉を有機溶媒に 8 時間浸漬し、クロロフィルの溶出割合を測定するもので、既存のクチクラ層変異体の解析でクチクラ層の欠損を評価する目的で行われている実験である。予測に反して、野生型系統と *pe lg* 変異体間でクロロフィル溶出の割合に差異は見られなかった (Fig. 13)。

クチンおよびワックス画分のメタボライトプロファイリング

赤熟果におけるクチンおよびワックスの組成をメタボライトフィンガープリンティングによって推定した。Fig.14 はクチン画分から得られた典型的なクロマトグラムである。全体的な total ion chromatograms (TICs) のパターンは、野生型系統間では類似していた (Fig. 14a-c)。しかし、*pe lg* 変異体のクチン画分から得られた TIC では、リテンションインデックス (RI) が 2000 から 2600 の位置に存在する多くのピークが著しく減少していた (Fig. 14d)。いくつかの代謝産物については、化合物の同定ができた (Table 2) もの、他の多くの主要なピークについては、標品を入手することができなかったため、同定ができていない。今後クチン構成要素の更なる分析を行い、*pe lg* 変異体のクチクラ層形成異常について解明する必要がある。

ワックス画分から得られた TICs を Fig. 15 に示した。クチン画分の分析結果とは異なり、ワックス画分から得られた TIC のパターンは、野生型系統、*pe lg* 変異体間で類似していた。

1-4 考察

pe lg 変異体における果実クチクラ層の表現型

本研究では、*pe lg* 変異体の表皮を組織学的、生理学的に解析を行った。*pe lg* 変異体の果皮は野生型系統よりも明らかに薄く(Fig. 2e-j)、クチン構成要素も少ないこと(Fig. 14)が明らかになった。更に、*pe lg* 変異体の果実表皮ではナリンゲニン等のフラボノイドの蓄積が抑制されていることが明らかになった(Fig. 2c-d; Fig. 3)。果実のフラボノイドは、果皮に蓄積されるため(Hunt and Baker, 1980)、フラボノイドは、*pe lg* 変異体の極めて薄いクチクラ層に多く存在しないと推察される。現在までに、果皮のフラボノイドが減少することが知られているトマトの変異体は、*y* と *DFD* のみである(Saladié et al, 2007; Adato et al, 2009; Ballester et al, 2010)。しかし、これらの変異体は、*pe lg* 変異体とは異なり、果皮のクチクラ層は野生型と同様に形成される。更に、*pe* と *y* については遺伝学的な解析が行われており、これらは独立した単因子の劣性遺伝子で、*pe* のほうが上位(epistatic)であることが示されている(Kerr, 1982)。従って、*pe lg* は *DFD*、*y* とは異なる特性を持った、果皮のフラボノイド含量に影響を与える新規の変異体である。

トマトにおける *lycopersicum esculentum eceriferum (lecer)* 6 変異体は C31 アルカンが果実のワックスから欠失しており、果皮における水の透過性が上昇している。このため、赤熟果は水分が減少しており、しわが出来ている(Vogg et al, 2004; Leide et al, 2007)。この結果は、果皮のワックスのうち、長鎖のアルカンが水分の透過性および適切な蒸散の調節に関与している可能性を示唆している。これ以外のトマトにおけるクチクラ層関連変異体として、*pe lg* 変異体と類似した *cd1*, *cd2*, *cd3* 変異体が報告されている(Isaacson et al, 2009)。しかし、一連の *cd* 変異体は果皮のクチクラ層のみに表現型が出ており、葉のクチクラ層に影響がない、とされている。この点において、*cd1*, *cd2*, *cd3* 変異体は *pe lg* 変異体とは

異なる。一連の *cd* 変異体のうち、*cd2* 変異体の果実の蒸散量は、野生型系統と類似している。生化学的な解析によって、*cd1*, *cd2*, *cd3* 変異体は、クチンの構成要素が著しく減少している一方、ワックスの総量については野生型系統 M82 と比較して、大きな差が無いことが示されている (Isaacson et al, 2009)。これらの結果から、ワックスとクチンの両方が水の透過性や日持ち性に寄与しており、また双方は物理的あるいは構造的に相互作用することで、表皮の透過性を調節していることが示唆される。*lecer6* とは異なり、*pe lg* 変異体は赤熟果のステージで果実にしわは認められない (Fig. 2b)。このため、*pe lg* 変異体では、葉の水分透過性は上昇している一方 (Fig. 8a-b)、クチクラ層が極めて薄いにもかかわらず、果実の蒸散量は野生型と同等レベルに維持されていることが明らかになった。しかし、TB テストによれば、*pe lg* 変異体の果皮の水分浸透性は、野生型よりも高いことが示唆された (Fig. 7c-d)。このため、トマト果皮の水分透過性は外から内、内から外で異なる特性を持つ可能性がある。実際に、TB テストによって、外部から侵入した水は、クチクラ層を透過して果実内に浸入していた (Fig. 7e)。一方、果実内部の水は蒸散されるが、その量は野生型系統と比較して少ないか、差異がみられないレベルであった (Fig. 9)。この事項に関しては、更なる解析が必要である。

***pe lg* 変異体における葉のクチクラ層の表現型**

TEM を用いて野生型系統と *pe lg* 系統の葉のクチクラ層の構造を調査した。*pe lg* 変異体では、野生型と比較してクチクラ層の電子密度が低下していた。同様に、シロイヌナズナの *long-chain acyl-CoA synthetase (lacs) 2*, *glycerol-3-phosphate acyltransferase (gpat) 4/8*, *wax2*, *cyp86a2* 変異体においてもクチクラ層の電子密度低下が報告されている (Chen et al, 2003; Schnurr et al, 2004; Xiao et al, 2004; Li et al, 2007)。これらの

中でも *lacs2* 変異体は葉の裏面でクチクラ層が減少する一方、葉の表側は影響がみられない。*pe lg* 変異体では野生型系統と比較して、葉の裏側は差異がみられない (Fig. 6h) もの、葉の表側のクチクラ層が薄くなる表現型 (Fig. 6l) がみられており、片側のみに表現型が出る、という点で *lacs2* 変異体と類似している。しかし、葉の裏側の表面を観察した結果、孔辺細胞や表皮細胞の形状が *pe lg* 変異体では変化していた (Fig. 4d)。この表現型は、*lacs2* 変異体でも確認されている (Schnurr et al, 2004)。このため、*pe lg* 変異体では、葉の両面のクチクラ層に影響が及んでいる可能性がある。また、*pe lg* 形質は、クチクラ層の構造だけでなく、表皮構造に直接影響を与えている可能性もある。また、特徴的な淡緑色の葉は、表皮構造の変化に起因する光の反射特性の変化 (Koornneef et al, 1989) であるか、あるいはクロロフィル *b* 含量の増加が原因である可能性が示唆されるため、今後更なる解析が必要である。

水分透過性、蒸散量の上昇といった生理的特性の変化は (Fig. 7; Fig. 8)、*gpat4/8*, *lacs2*, *cyp86a2*, *pe lg* に共通してみられる表現型である。*pe lg* 変異体は、野生型系統と比較して気孔の数も差が見られないことから、今回観察されたこれらの生理的变化は、クチクラ層の欠損 (Fig. 2; Fig. 6) に起因すると推察される。また、これらの変化は、Fig. 4 で観察された表皮構造の変化も部分的に関与している可能性もある。

過去の研究では、*lacs2* 変異体はクロロフィル溶出試験で、野生型よりも高い溶出率を示したが、本研究では、*pe lg* 変異体と野生型系統の間でクロロフィル溶出率に明確な差異は見られなかった (Fig. 13)。今のところ、*pe lg* 変異体が高いクロロフィル溶出率を示さなかった理由は不明である。有機溶媒を用いたクロロフィルの抽出は、植物体の組織に大きな影響を与える処理であり、結果的に野生型系統と *pe lg* 変異体の差がマスクされてしまった可能性が原因として考えられる。

pe lg 変異がクチクラ層形成に与える影響は、これまでにシロイヌナズナで解析されてきたクチクラ層関連変異体とは異なることを示唆している。更に、*pe lg* 変異体がこれまでに報告されているトマトのクチクラ層関連変異体 (*lecer6*, *DFD*, *cd1*, *cd2*, *cd3*) と異なる表現型を示すことも鑑みて、*pe lg* 変異体は、トマトの新規クチクラ層関連変異体である可能性があると結論付けた。

Table 1. *pe* および *lg* 形質の分離比検定

表現型	個体数	頻度
<i>PE LG</i>	252	0.754
<i>pe LG</i>	0	0.000
<i>PE lg</i>	0	0.000
<i>pe lg</i>	82	0.246
Total	334	
Probability for single gene, 3:1 ratio	>0.99	

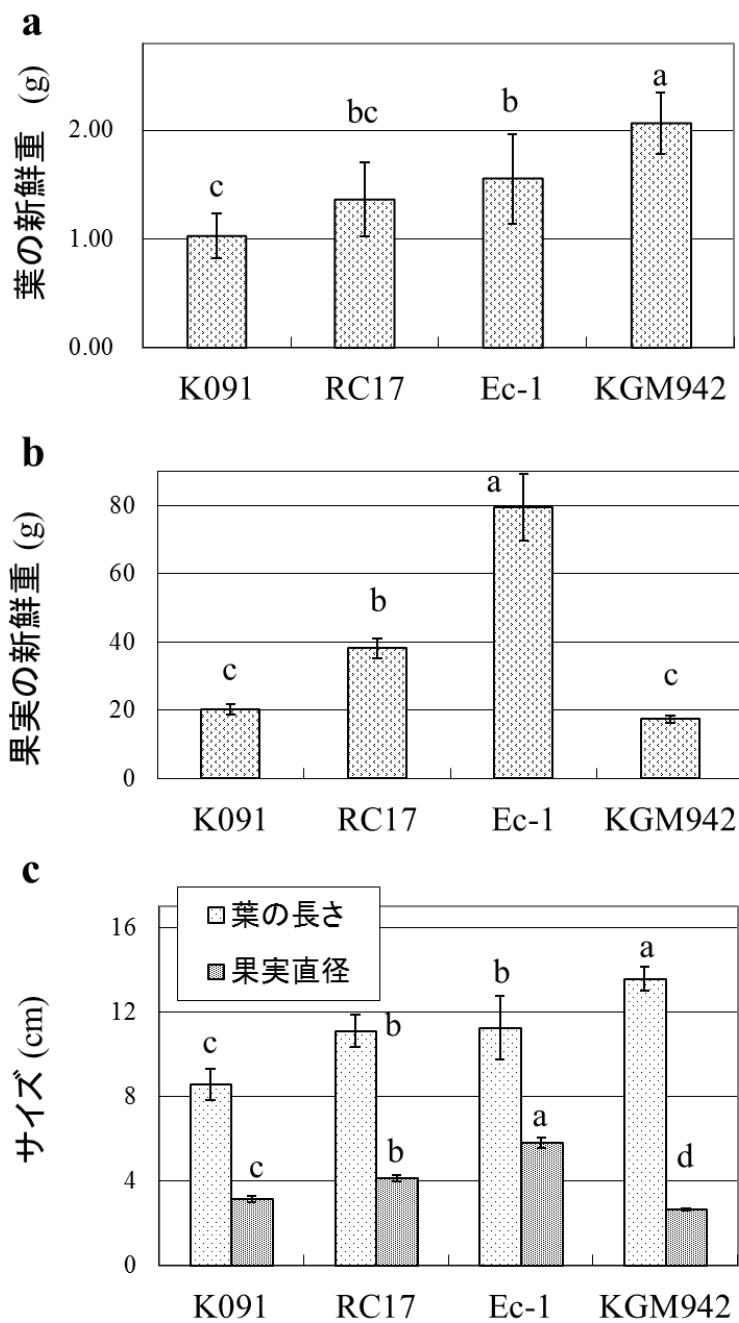


Fig. 1 *pe lg* 変異体と野生型系統の葉、果実の新鮮重および大きさ
a 葉の新鮮重 **b** 果実の新鮮重 **c** 葉の長さと果実の直径
 対照として野生型の 3 系統 (K091, RC17, Ec-1) を用いた。KGM942 は *pe lg* 変異体である。垂直の線は標準偏差を示している ($n = 3$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

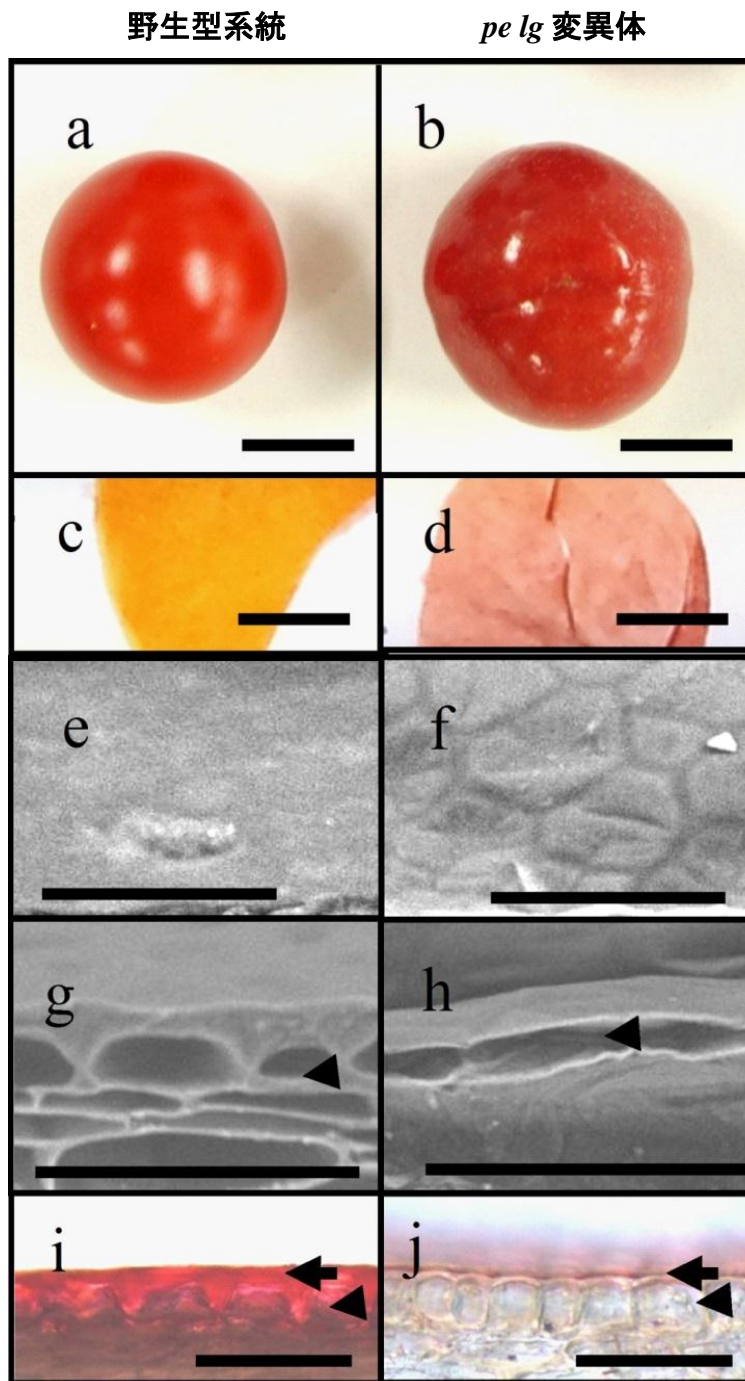


Fig. 2 野生型系統と *pe lg* 変異体の果実の比較

(a)野生型系統、(b)*pe lg* 変異体の赤熟果。(c)野生型系統、(d)*pe lg* 変異体から単離した果皮。SEM で撮影した(e)野生型系統、(f)*pe lg* 変異体の果皮表面。SEM で撮影した(g)野生型系統、(h)*pe lg* 変異体の果皮断面。光学顕微鏡で観察した(i)野生型系統、(j)*pe lg* 変異体の果皮断面。Arrowhead, arrow はそれぞれ表皮細胞、クチクラ層を示す。スケールバーは、(a-d) 1 cm, (e-j) 50 μ m を示す。

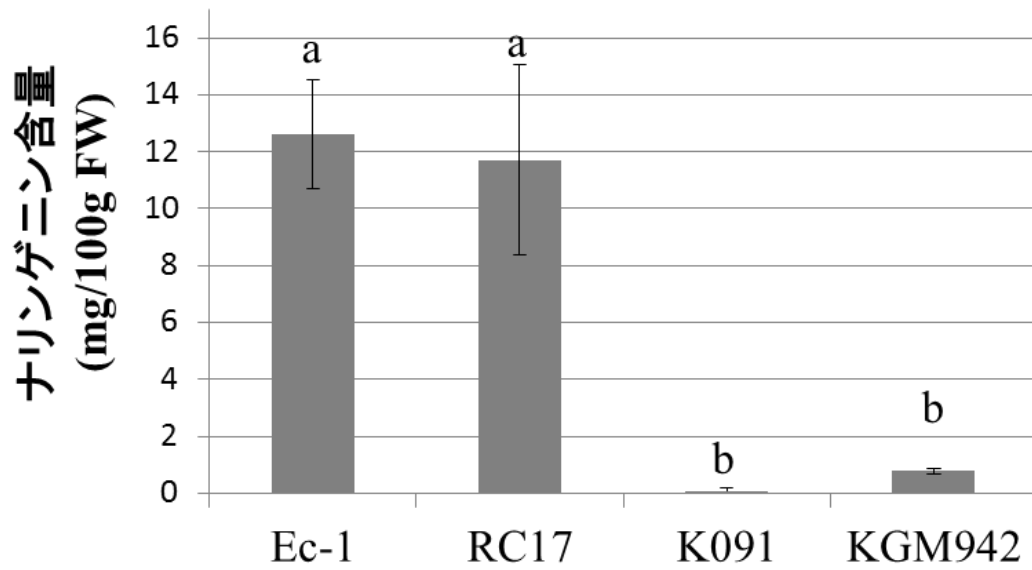


Fig. 3 野生型系統および *pe lg* 変異体における赤熟果果皮のナリンゲニン含量
 垂直の線は標準偏差を示す ($n = 3$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

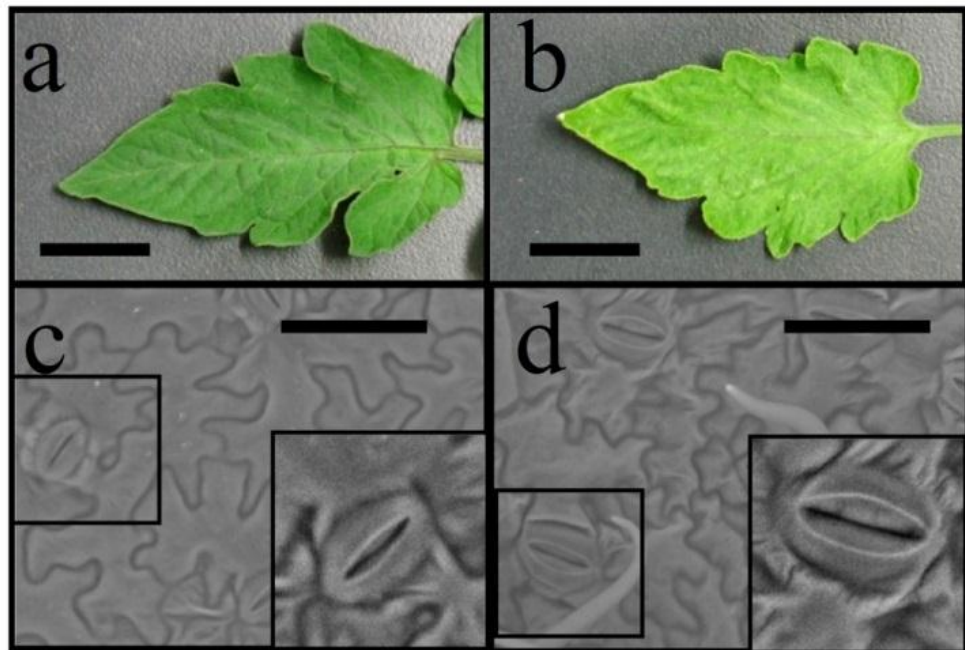


Fig. 4 野生型系統 RC17 と *pe lg* 変異体の葉の比較

(a)野生型系統と(b)*pe lg* 変異体の 5 番目に展開している葉の写真。SEM で撮影した(c)野生型系統と(d)*pe lg* 変異体の葉表面。はめ込み写真は気孔の拡大図を示す。スケールバーは、(a-b) 1 cm、(c-d) 20 μ m を示す。

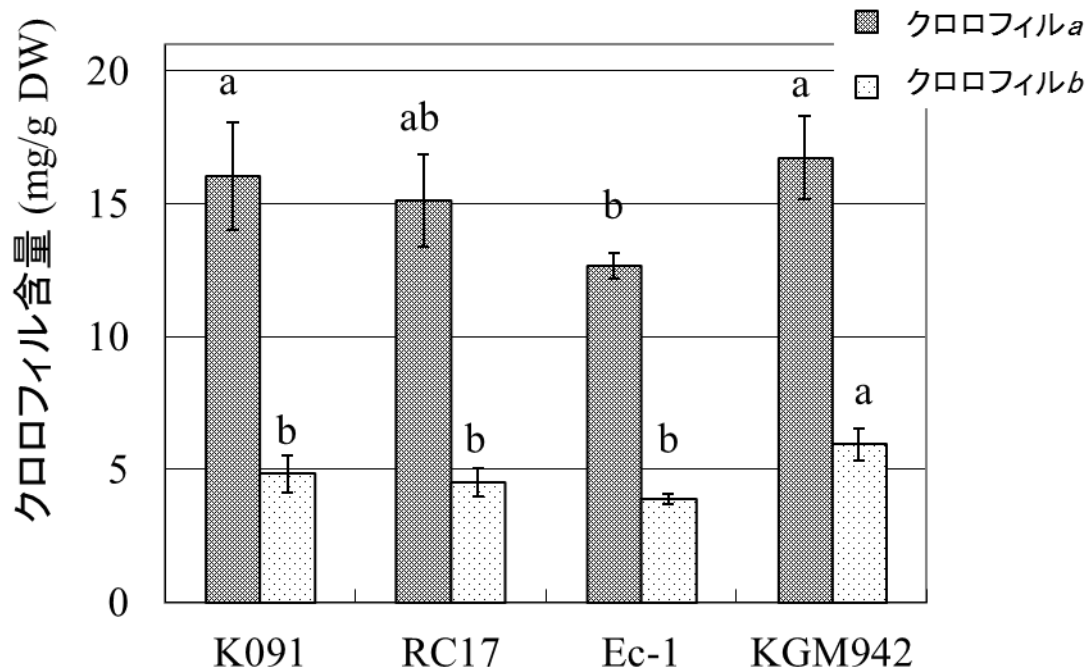


Fig. 5 野生型系統と *pe lg* 変異体のクロロフィル含量
 垂直の線は標準偏差を示す ($n=5$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

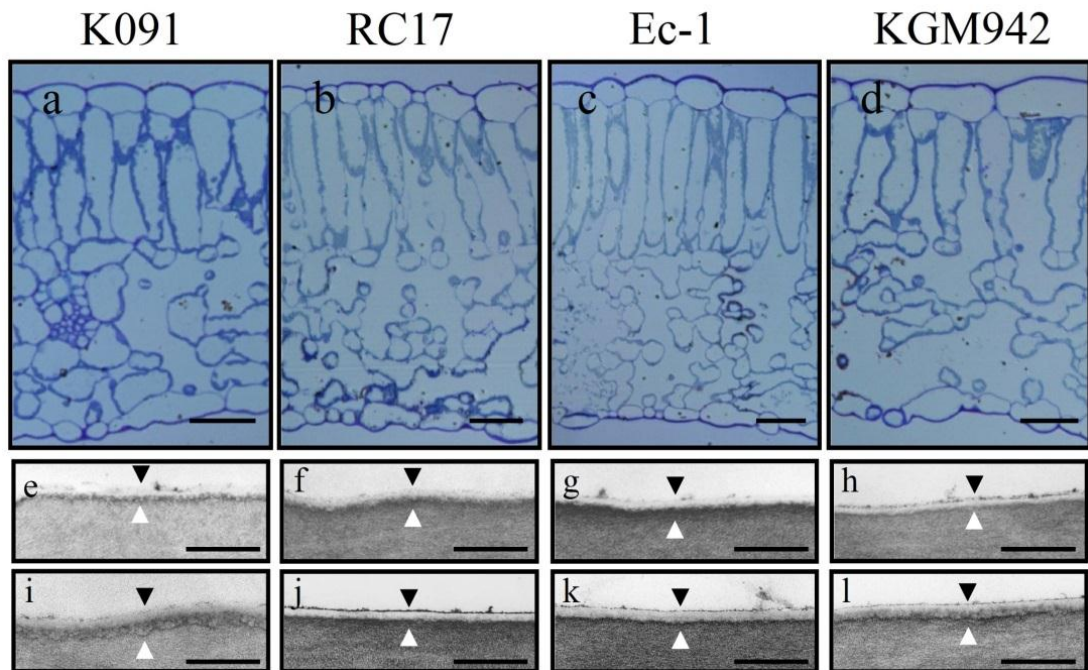


Fig. 6 野生型系統および *pe lg* 変異体の葉の断面

(a-d)光学顕微鏡による葉の断面の観察 (e-l)TEM による葉表面(e-h)および葉裏面(i-l)の表皮断面の観察。

Cuticle proper は黒矢印で示し、クチクラ層は白矢印で示す。スケールバーは (a-d) 50 μ m、(e-l) 500 nm を示す。

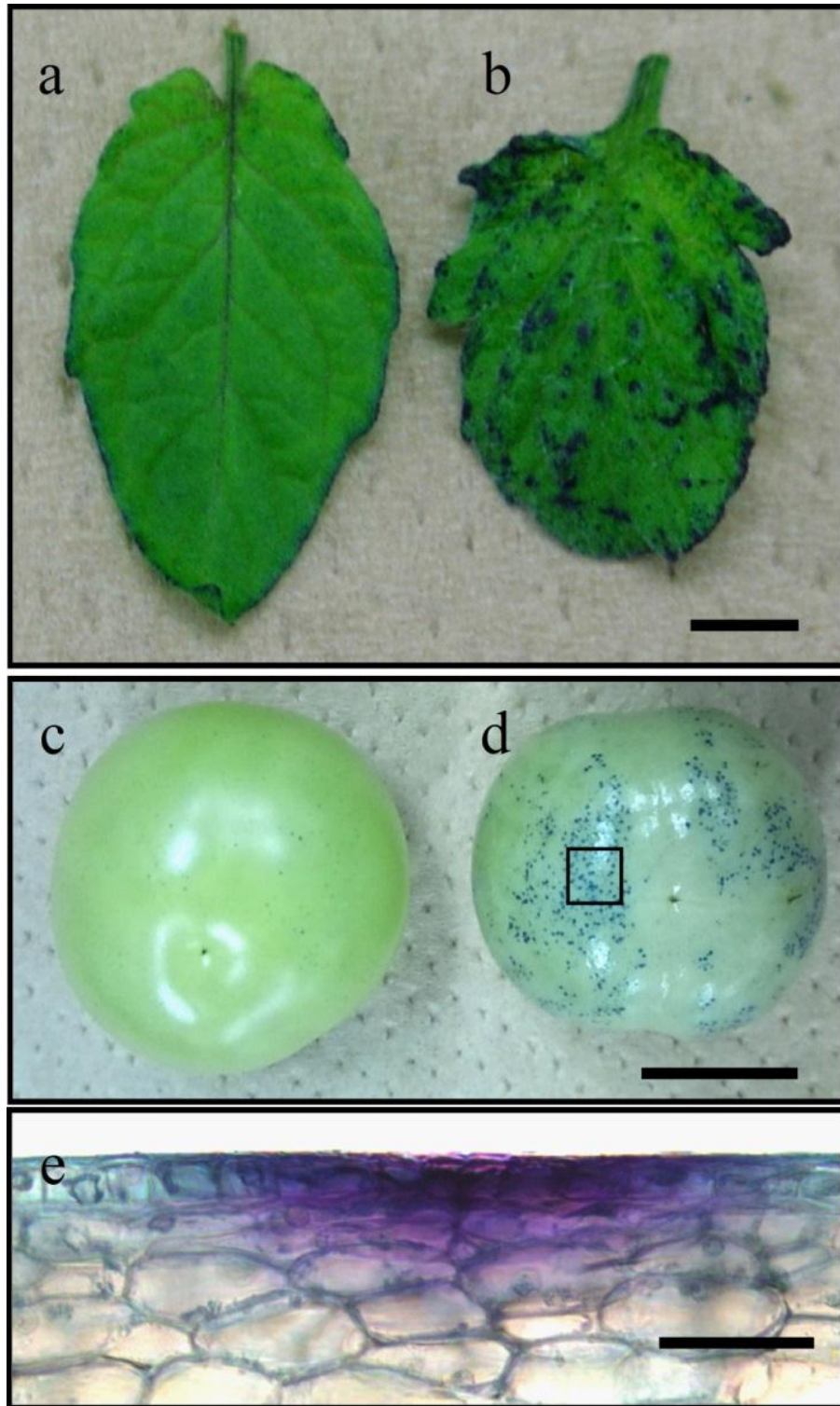


Fig. 7 葉および果実の水分浸透性の比較
 (a,c) 野生型系統および(b, d) *pe lg* 変異体の TB 染色パターン。
 (e) TB 染色されたスポットの断面。スケールバーは(a-d)1 cm, (e)50 μ m

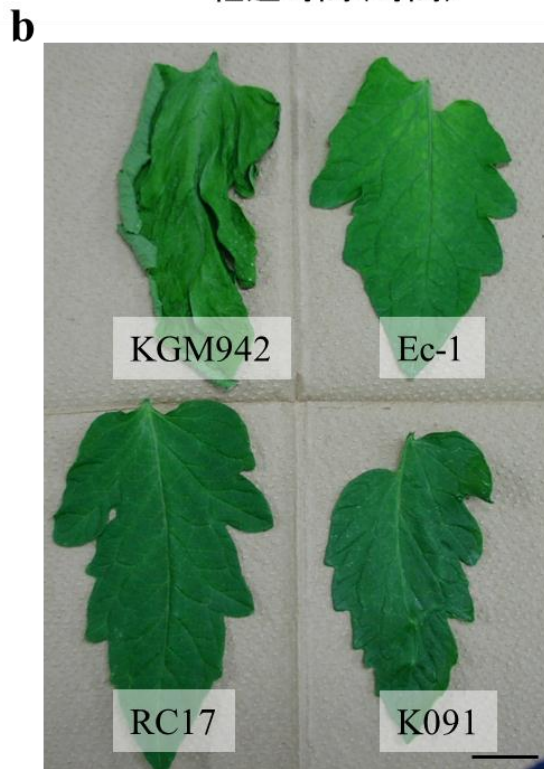
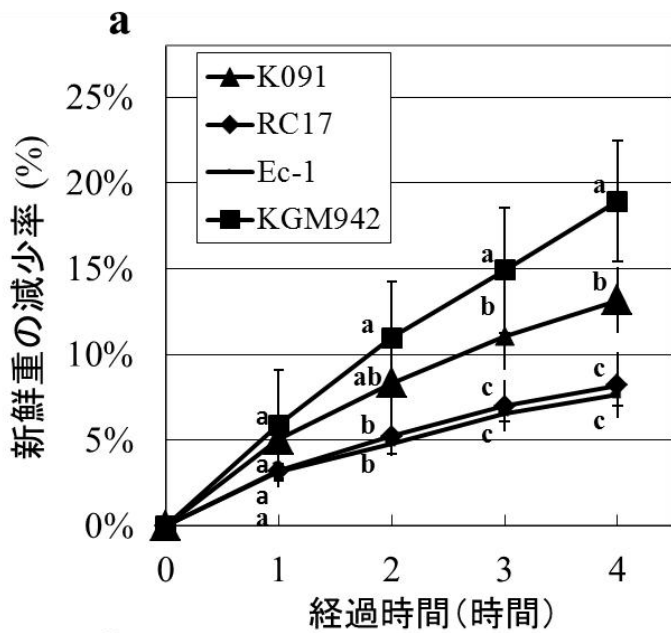


Fig. 8 野生型系統と *pe lg* 変異体との蒸散量の比較

(a) 野生型 3 系統と *pe lg* 変異体の新鮮重の減少率。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。検定は時間ごとに行い、異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。(b) 野生型 3 系統と *pe lg* 変異体の葉。スケールバーは 1 cm を示す。

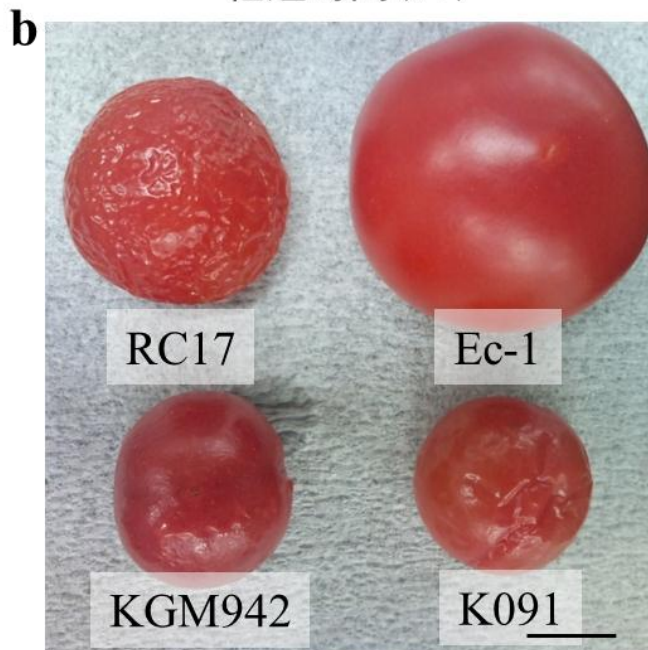
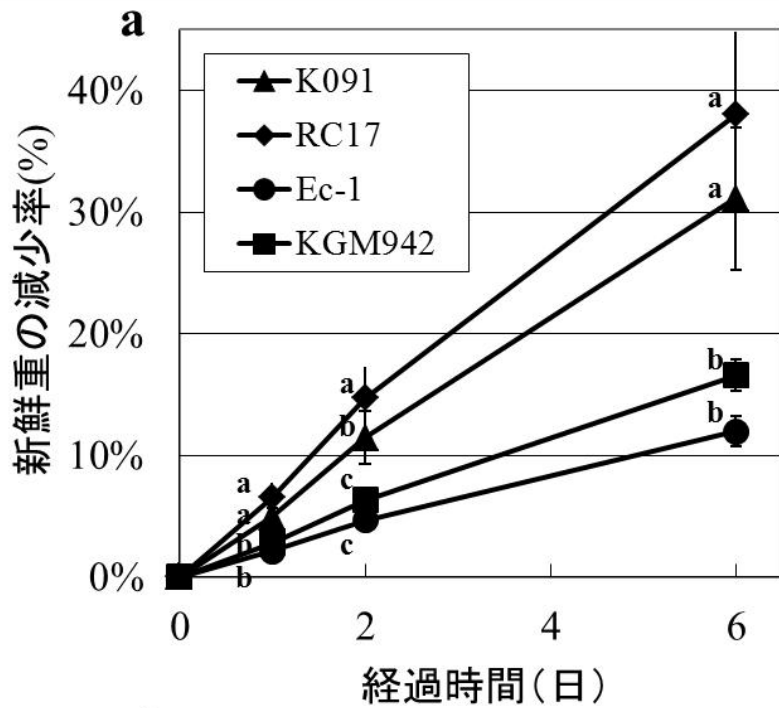


Fig. 9 野生型系統と *pe lg* 変異体の赤熟果における蒸散特性の比較
 (a)野生型系統と *pe lg* 変異体の赤熟果における新鮮重の減少率。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。検定は時間ごとに行い、異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5%で有意であることを示す。(b) 6日経過後の野生型系統と *pe lg* 変異体の果実。スケールバーは 1 cm を示す。

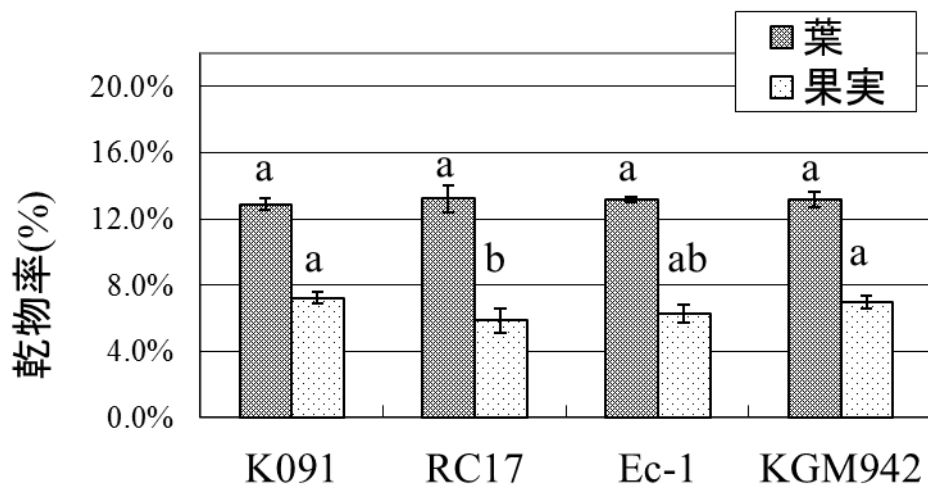


Fig. 10 野生型系統と *pe lg* 変異体の乾物率

垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

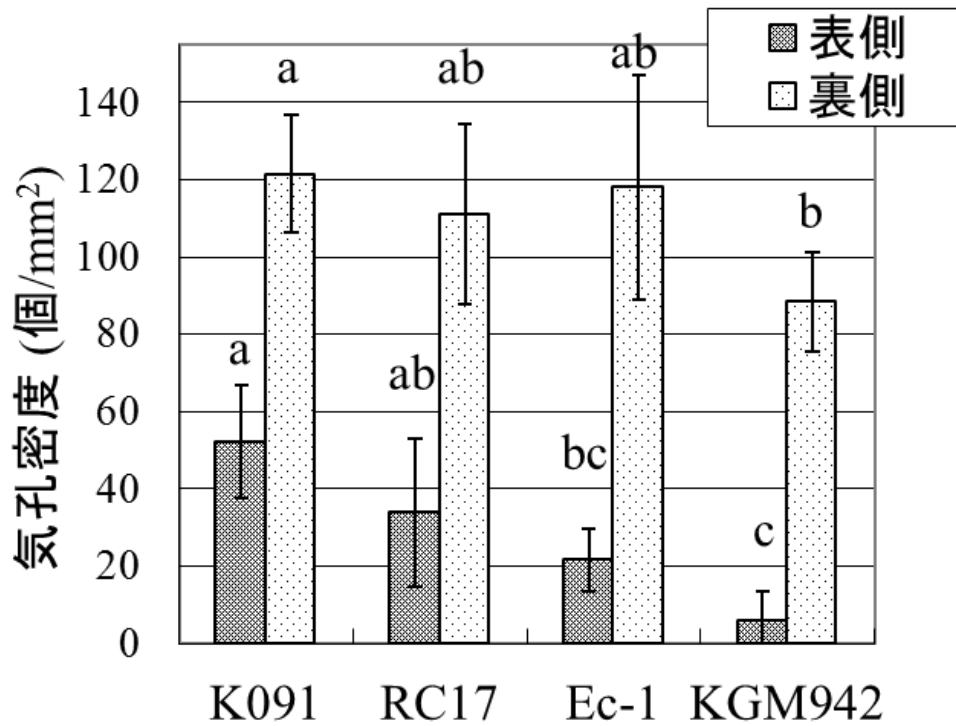


Fig. 11 野生型系統と *pe lg* 変異体の気孔密度

垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

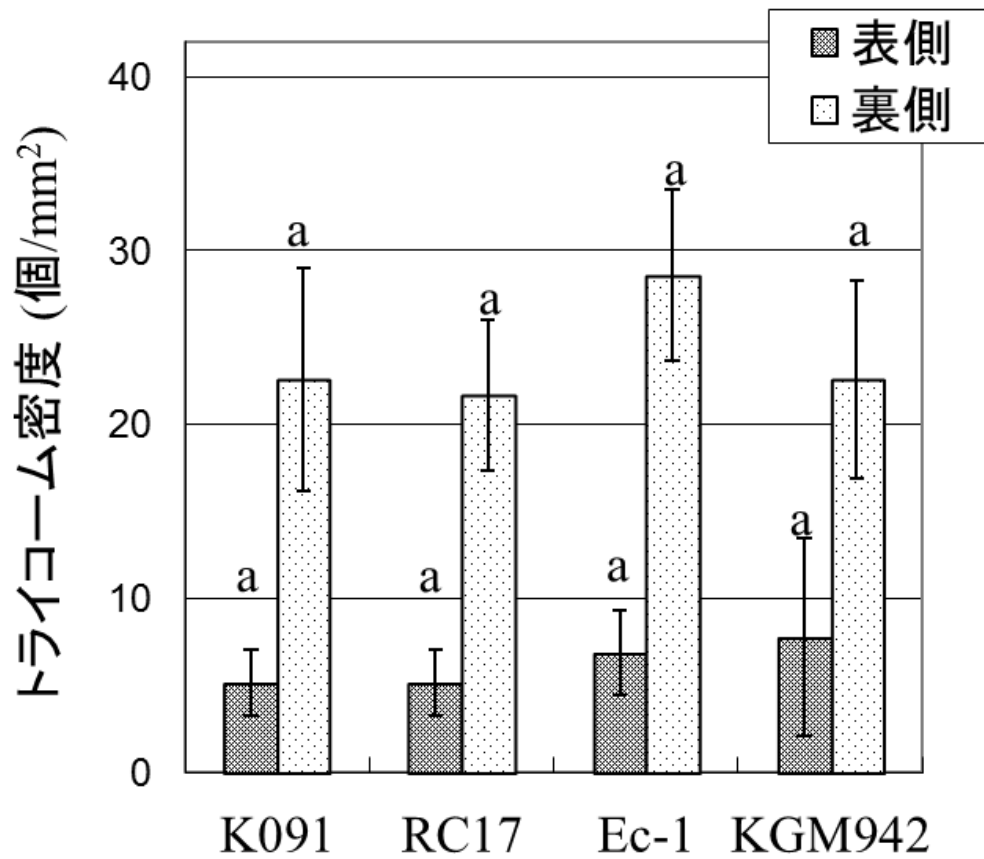


Fig. 12 野生型系統と *pe lg* 変異体のトライコーム密度
 垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

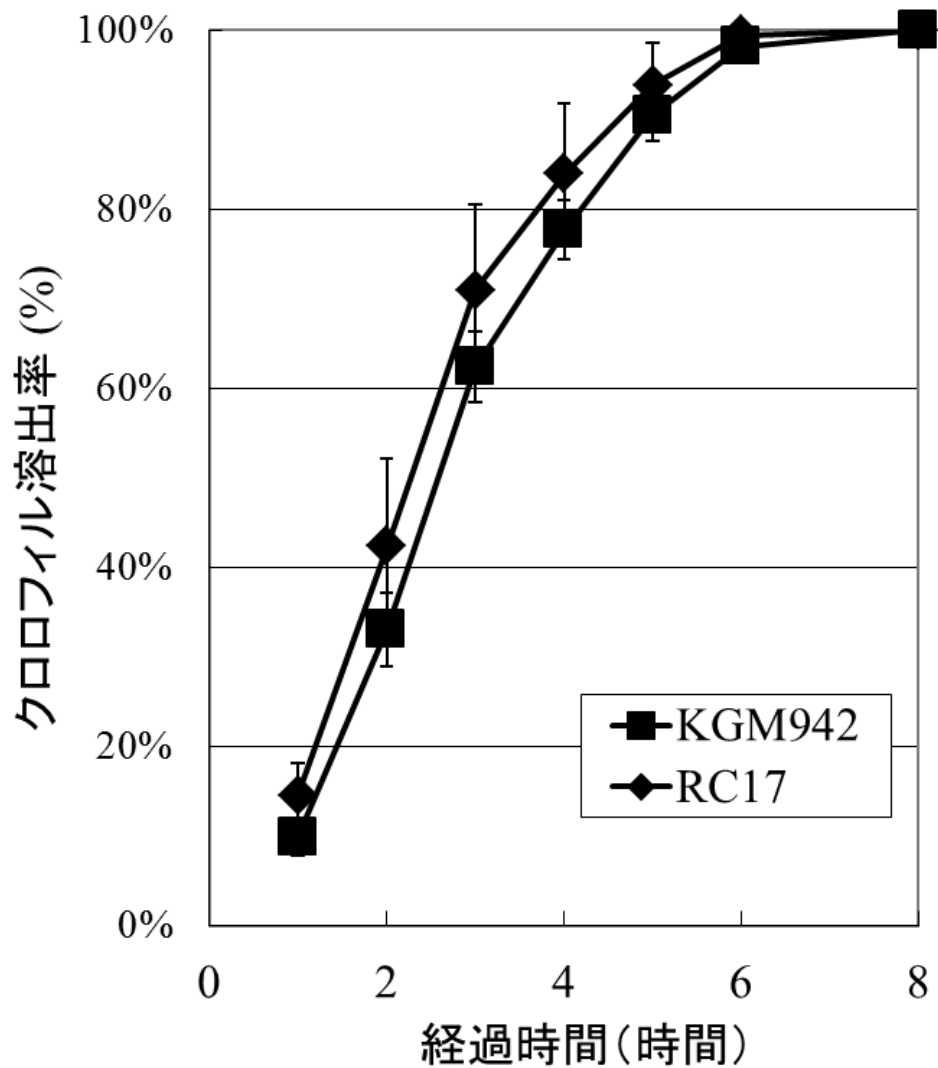


Fig. 13 野生型系統および *pe lg* 変異体の葉を用いたクロロフィル溶出試験

野生型系統および *pe lg* 変異体の葉を 80%エタノール中に 8 時間浸漬させた。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。

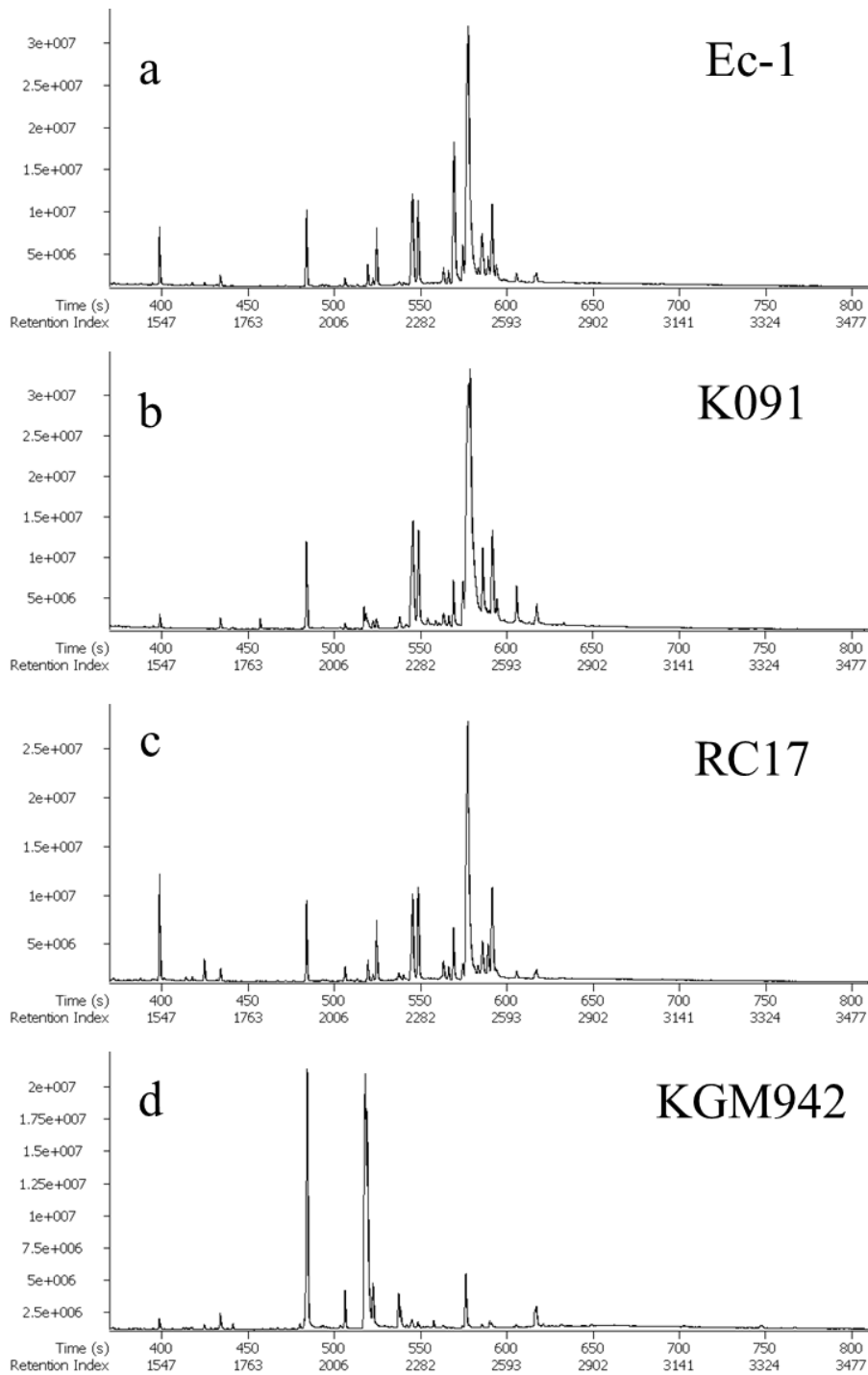


Fig. 14 クチン画分の total ion chromatograms (TICs)

(a) Ec-1, (b) K091, (c) RC17, (d) KGM942 の TIC。X 軸はリテンションタイムを示し、Y 軸は intensity を示す。

Table 2 同定された代謝産物および Retention Index

Metabolite	Retention Index
<i>n</i> -Tritriacontane	3300.0
Triacontane	2999.4
alpha-Tocopherol	3152.4
D-Sucrose	2613.0
Oleate	2205.0- 2227.0
<i>n</i> -Octadecanoic acid	2236.0
Linoleic acid	2208.0
<i>n</i> -Nonacosane	2900.1
<i>n</i> -Hentriacontane	3100.2
<i>n</i> -Hexadecanoic acid	2039.2
<i>n</i> -Dotriacontane	3199.8
Citric acid	1800.4
16-Hydroxyhexadecanoic acid	2379.5
π Eudesmol	1765.3
<i>n</i> -Tetradecanoic acid methyl ester	1721.5
<i>n</i> -Tetracosanoic acid	2828.7
<i>n</i> -Tetracosanoic acid methyl ester	2729.5
Stigmasterol	3316.8
beta-Sitosterol	3382.1
Phosphoric acid	1261.6
4-Oxo-pentanoic acid, ethyl ester	1061.5
Mannose, 6-deoxy-	1608.6
Hexanoic acid	1070.5
16-hydroxy-hexadecanoic acid, methyl ester	2272.9
<i>n</i> -Hexadecanoic acid methyl ester	1924.3
<i>n</i> -Heptadecanoic acid methyl ester	2024.9
Glycine	1227.9
1,6-Anhydro-beta-D-Glucose	1693.6
1-O-methyl-, alpha-D-Glucopyranoside	1864.9
Ethyl Laurate	1990.5
<i>n</i> -Eicosanoic acid methyl ester	2326.5
Linolenic acid methyl ester	2107.3
7-Hexadecenoic acid methyl ester	1904.5
Eremophil-1(10)-ene	1707.4 1750.2
1-Propene-1,2,3-tricarboxylic acid, trimethyl ester	1437.7
Trimethyl 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid	1540.4

取得した Retention index を NIST/EPA/NIH mass spectral library (NIST08), Golm Metabolome Database or our custom library と比較することで、化合物の推定を行った。

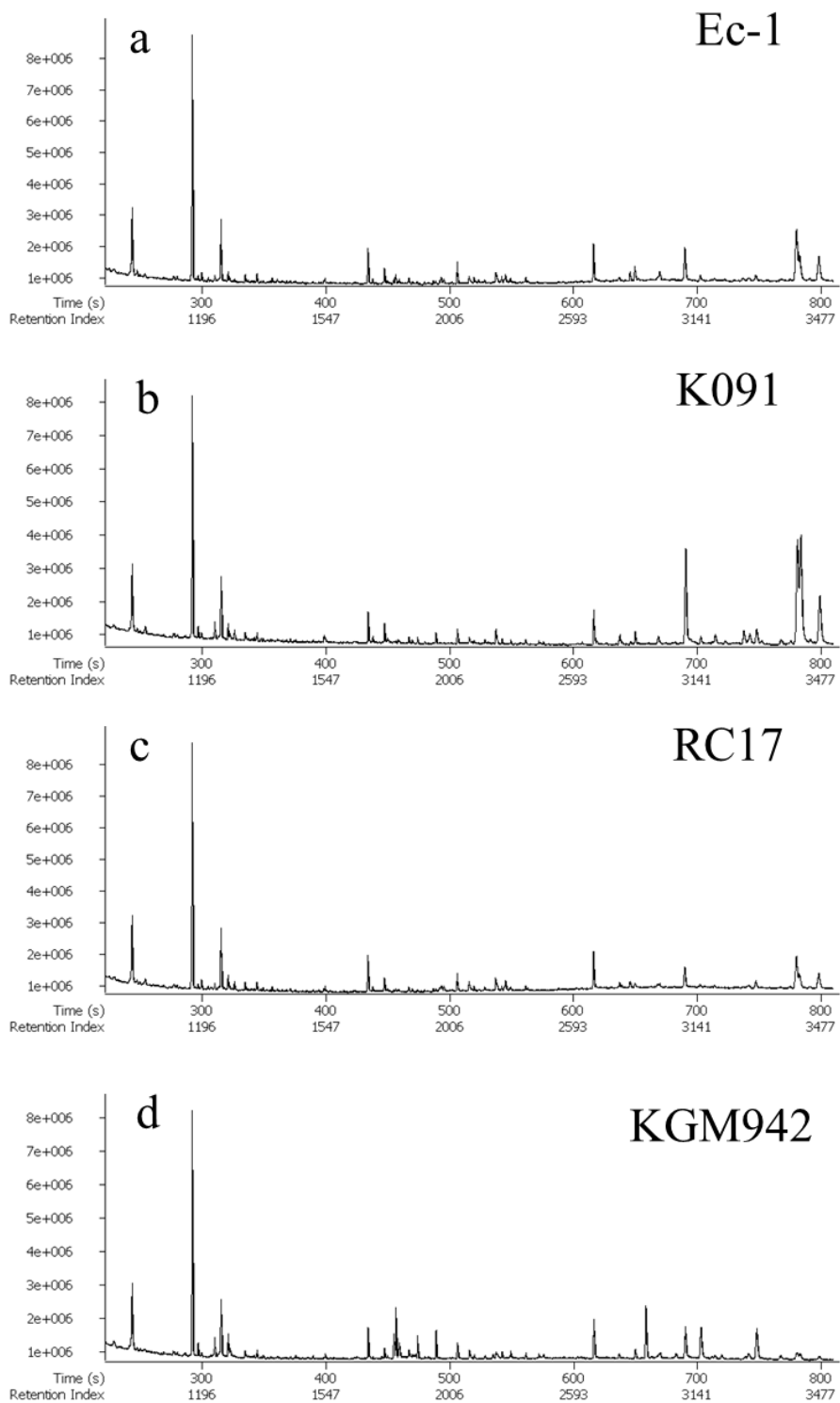


Fig. 15 ワックス画分の total ion chromatograms (TICs)

(a) Ec-1, (b) K091, (c) RC17, (d) KGM942 の TIC。X 軸はリテンションタイムを示し、Y 軸は intensity を示す。

第 2 章 *pe/lg* 形質の原因遺伝子の単離

2-1 緒言

第 1 章で *sticky peel (pe)* と *light green (lg)* という変異を持った系統 KGM942 の解析を行い、この2つの表現型は単因子の劣性遺伝子に起因する可能性が高いことを明らかにした。また変異体ではクチンの量、組成が大幅に変化する一方、ワックスの量、組成もわずかに変化することを明らかにした。更に、葉および果実のクチクラ層において水分浸透性が上昇することを明らかにした。これらのことから、*pe lg* 変異体の原因遺伝子は、クチクラ層の生合成に深く関与している遺伝子であることが示唆された。本章では、*pe* および *lg* の原因遺伝子を同定するため、*pe lg* 形質をラフマッピングして、原因遺伝子が第 1 染色体長腕に座乗することを明らかにした。更に Introgression Line (IL)を用いたファインマッピングを行い、*pe* 形質の原因がタイプ IV のホメオドメインロイシンジッパー (HD-ZIP IV) 型の転写因子 *CD2* の変異にあるという報告 (Nadakuduti et al, 2012) の検証を行った。また、*pe* 形質と *lg* 形質が *CD2* 遺伝子の変異に起因するか検証するため、*CD2* 遺伝子の発現抑制システムを作出し、表現型の解析を行った。その結果、*CD2* 遺伝子発現抑制システムでは、果実、葉において *pe lg* 形質が再現されることを確認した。

2-2 材料および方法

植物材料

pe lg 変異体の原因遺伝子を同定するため、*pe lg* 変異体である KGM942 と野生型系統であるレジナ (Sakata seeds, Japan) を交配し、F₂ 分離集団を作出した。また、ファインマッピングを行うため、トマト第 1 染

染色体の動原体領域から TG295 (92.7cM)までの領域が近縁野生種 *Solanum pennellii* の染色体に置換された IL1-2 (Eshed and Zamir, 1994) と KGM942 を交配して、F₂ 分離集団を作出した。

PE LG 遺伝子のマッピング

これまでの報告では、PE LG 遺伝子は第 1 染色体に座乗するとされている (Kerr, 1982)。PE LG 遺伝子の位置を決定するため、KGM942 とレジナを交配して得られた F₂ 分離集団を 334 個体栽培し、第 1 染色体に座乗する 3 個のマーカー (C2_At2g38730, C2_At3g04710, SSR222) でタイピングを行った (Table 3)。PE LG 遺伝子をファインマッピングするため、KGM942 と IL1-2 を交配して得られた F₂ 分離集団を 336 個体栽培し、*S. pennellii* 由来の染色体断片が挿入されている領域に座乗する 12 個のマーカー (Table 4) でタイピングを行った。

CD2 遺伝子発現抑制用ベクターの構築

CD2 遺伝子の発現抑制を狙ったアンチセンス用コンストラクトを作成するため、CD2 遺伝子の完全長 cDNA クローンを、データベース MiBase (Yano et al, 2006) を通して取得した (LEFL2020A13, NBRP)。完全長 cDNA クローンを鋳型として、2 個の遺伝子特異的プライマー CD2AS-F: TTTGAGCTCATGAATTTTGGGGGTTTTCT, CD2AS-R: TTTGGATCCTTAGCTTTCGCATTGAAGTG を用いて、翻訳領域を PCR で増幅させた。増幅断片は制限酵素 *Bam*HI, *Sac*I で消化し、MiniElute (QIAGEN) で精製した。バイナリーベクター *pBII21* もまた *Bam*HI, *Sac*I で消化し、Antarctic Phosphatase (New England BioLab) で DNA 末端を脱リン酸化した。酵素処理されたベクター DNA を、QIAEXII Gel Extraction kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製された

PCR 断片と *pBI121* は DNA Ligation Kit LONG を用いてライゲーション反応を行った。完成したコンストラクトは *pBI-CD2-AS* とした。

pBI-CD2-AS は *Agrobacterium tumefaciens* GV2205 に freeze thaw method (An et al, 1988) で導入した。コンストラクトはアグロバクテリウム法によって、Micro-Tom に導入した (Sun et al, 2006)。形質転換した植物体は、100 mg / L のカナマイシンを含む Murashige-Skoog (MS) 培地下で選抜を行い、形質転換体を作成した後に Cytofluorometer で 2 倍体を選抜した。T0 あるいは T1 世代を以降の解析に用いた。

遺伝子発現解析

CD2 遺伝子の発現解析は植物体の根、葉、花、緑熟果、赤熟果から RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。cDNA は 1 μ g の全 RNA より ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて合成した。RT-PCR は KOD-FX を用いてサーマルサイクラーを以下の条件で動作させた; 94 $^{\circ}$ C 2 分で DNA 変性後、98 $^{\circ}$ C 10 秒、59 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分を 30 サイクル。対照として全組織で発現している *Actin* 遺伝子を以下の遺伝子特異的プライマーで増幅させた;

Tom52F: CCTAGTATTGTGGGACGTCC

Tom52R: TAGATCCTCCGATCCAGACA

CD2 遺伝子の cDNA を増幅するために、以下のプライマーを用いた;

CD2_1928F: TCTGGGCTGTCGTTGATGTA

CD2_4775R: CCATTACATGAAGGCCCATTT

形質転換体における *CD2* 遺伝子抑制の度合いを調査するために、*CD2* 遺伝子の 5'UTR を含む以下のプライマーを用いた;

CD2_106F: GGATTCGTCCTTGTGTCTCCTCTACCTCTC

CD2_743R: CCTTCATCTGAGTTCTACGATTTTG

CD2 遺伝子の mRNA の蓄積量は、QIAXcel (QIAGEN)で増幅された DNA 断片のピークの高さ測定し、Actin 遺伝子のピークの高さに対する比率を算出して比較した。

クロロフィル含量の測定

クロロフィル含量は Porra らの方法に基づいて行った(1989)。100-200 mg の成熟した葉の断片を温室内で栽培している異なる個体からサンプリングした。葉の断片は 3ml の *N,N*-ジメチルホルムアミドに浸漬し、4°C で一晩静置した。葉のクロロフィル含量は以下の数式で換算した；

$$\text{Total micrograms of chlorophyll } a = 12.00 * \text{Abs}_{664} - 3.11 * \text{Abs}_{647}$$

$$\text{Total micrograms of chlorophyll } b = 20.78 * \text{Abs}_{647} - 4.88 * \text{Abs}_{664}$$

葉・果実の水分透過性評価

形質転換体の葉および果実の水分透過性を評価するため、蒸散量の測定 (Kimbara et al, 2012)、トルイジンブルー (TB) テストを行った (Tanaka et al, 2004)。蒸散量の測定では葉のサンプリングの前に、気孔を閉じさせるために 500 mg/L のアブシジン酸 (ABA) を葉に施用した。5 枚の成熟した葉をサンプリングし、25 °C、暗条件にて 0, 1, 2, 3 時間後の新鮮重を測定した。TB テストは、葉を 0.05 % の TB 水溶液に 1 時間浸漬することで行った。トマトの葉は疎水性が極めて高いため、0.05 % の Nonidet P-40 を TB 水溶液に添加下した。

果実の蒸散量は、赤熟果を 40 °C、暗条件にて 0, 1, 2, 3, 4 日後の新鮮重を測定することで行った。TB テストは緑熟果を用いて、葉の実験と同様に実施した。

組織学的観察

果実のクチクラ層は、Buda et al の方法 (2009) に基づいて SudanIV 染色を行い、観察を行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察は、Kimbara et al の方法 (2012) に基づいて行った。

光合成速度の測定

完全に展開した葉のうち、最も若い葉を光合成・蒸散測定装置 (LI-6400XT, Li-Cor, USA) を用いた測定に供試した。光合成速度 (A)、気孔コンダクタンス (G_s)、蒸散速度 (E) を 9:00 から 12:00 までの間に光合成有効光量子束密度 (PPFD) が 0, 50, 100, 200, 500, 1,000, 1,500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の条件下で測定を行った。測定の間、相対湿度は 70 %、 CO_2 濃度は 350ppm、葉面温度は $28\pm 0.5^\circ\text{C}$ の環境を維持した。水利用効率 (WUE) は (光合成速度 A) / (蒸散速度 E) を求めることによって算出した。AS38 の T1 世代を $CD2$ 遺伝子発現抑制系統として用いた。

気孔密度の測定

成熟した葉を走査型電子顕微鏡 (SEM, 300 倍、TM-1000, Hitachi High-technologies, Japan) を用いて、観察した。5 個体の植物体からサンプリングした葉を用いて表面、裏面ともに 0.36mm^2 の領域を撮影した。AS38 の T1 世代を $CD2$ 遺伝子発現抑制系統として用いた。

統計解析

統計解析はフリーソフトウェア R を用いて行った。多群間の平均値の比較は、分散分析 (ANOVA)、次いで Tukey HSD にて多重比較 ($p < 0.05$) を行った。2 群間の比較は t 検定によって行った。数値データは平均値および標準偏差 (SD) を示した。

2-3 結果

pe lg 遺伝子のファインマッピング

過去の文献では、*pe* と *lg* は分離することが報告されていることに加え、*PE* は第 1 染色体の長腕に座乗することが示唆されている。一方、第 1 章における研究の結果、KGM942 の *pe* と *lg* は同一の単因子劣性形質であることが示唆されている。本研究で得られた知見を検証するため、*pe lg* 変異体 KGM942 と野生型系統レジナを交配し、F₂ 分離集団を作出した。334 個体からなる F₂ 分離集団のうち、82 個体が淡緑色の葉、薄い果皮という典型的な *pe lg* の表現型を示した。これらの 82 個体に対して、KGM942 とレジナの間で多型が認められ、第 1 染色体の長腕に座乗する 3 個のマーカー (Table 3) を用いて遺伝子型のタイピングを行った。C2_At2g38730 (92.5 cM), C2_At3g04710 (95cM), SSR222 (97.5 cM) の組み換え価はそれぞれ 0.130, 0.154, 0.154 であった。このため、*pe lg* 形質の原因遺伝子は、C2_At2g38730 よりも動原体側にあることが明らかになった。

PE LG 遺伝子をファインマッピングするため、KGM942 と第 1 染色体の動原体から 92.7cM までの領域が *S. pennellii* の染色体に置換された IL1-2 との交配から得られた F₂ 分離集団を作成した。1,600 を超える個体を調査した結果、*pe* と *lg* は完全に連鎖しており、336 個体の *pe lg* 形質を示す個体が得られた。これらの F₂ 個体に対して、第 1 染色体の 55 から 73cM までに座乗する 12 個のマーカー (Table 4) で、遺伝子型のタイピングを行った。

その結果、solcap_snp_sl_100409, Solyc01g091500_1, C2_At3g61140, Solyc01g091720_1 は *pe lg* 形質と完全に連鎖した。絞り込まれた領域は、第 1 染色体長腕の、462.3kb の領域であった (Fig. 16)。Sol Genomics Network (SGN) で公開されている情報に基づくと、この領域には 56 個の open reading frame (ORF) が存在すると推測されていた。

その中に、クチクラ層形成に関与している転写因子 *CD2* 遺伝子が存在していた。*cd2* 変異体は、クチチンの量・組成が野生型とは異なり、水の透過性が上昇している、という点で *pe lg* 変異体と類似しているため、*PE* と *LG* は同一因子であり、*CD2* 遺伝子の変異がその表現型の原因であることが示唆された。この仮説を検証するため、*CD2* 遺伝子のゲノム配列を KGM942 とレジナで比較したところ、KGM942 において、8 番目のエクソンに 1 塩基の挿入を見出した (Fig. 16)。この挿入によって、以降の領域にフレームシフトが起こり、アミノ酸配列が異常となり、662 番目のアミノ酸で停止コドンが出現することが予測された。

仮に *pe* と *lg* が *CD2* 遺伝子の変異によって引き起こされるとすると、*CD2* 遺伝子は葉と果実の両方で発現しているはずである。このことを検証するため、各組織から抽出した RNA を用いて RT-PCR を行い、*CD2* 遺伝子の転写の有無を確認した結果、葉、果実を含むすべての組織で、*CD2* 遺伝子の発現が認められた (Fig. 17)。

ファインマッピングの結果と RT-PCR の結果より、*pe lg* 形質は、*CD2* 遺伝子の 1 塩基挿入が原因であることが強く示唆された。

***CD2* 遺伝子発現抑制系統における葉の表現型**

pe lg 変異体の表現型である、葉の淡緑色と葉および果実のクチクラ層欠損が *CD2* 遺伝子の破壊によって引き起こされることを実証するため、アンチセンス法によって *CD2* 遺伝子発現抑制系統を作出した。合計 18 の形質転換体を作成し、それぞれの *CD2* 遺伝子の発現レベルを T0 世代で調査した。Fig. 18a に示したように、*CD2* 遺伝子の発現量は AS12, AS16, AS17, AS18 で大幅に減少していた。これらの系統のうち、AS16, AS17, AS38 を以降の解析に使用した。得られた *CD2* 遺伝子発現抑制系統は全て正常に生育し、稔性も残されていた。

CD2 遺伝子発現抑制系統の若い葉は、*pe lg* 変異体である KGM942 と同様に淡緑色をしていた (Fig. 18b)。この表現型の原因を解明するため、葉のクロロフィル含量を測定した。野生型の Micro-Tom と抑制系統の間で、クロロフィル *a* の含量は差異が無かったが、クロロフィル *b* の含量は、抑制系統でわずかに高かった (Fig. 19)。一方、古い葉については、野生型と発現抑制系統で葉の色に顕著な差は見られなかったため (Fig. 18c)、葉が淡緑色となる表現型は、比較的若い葉に限られる表現型である可能性がある。

cd2 と *pe lg* 変異体は、クチクラ層構成成分の量及び組成に影響を与えることが報告されているため、次に葉のクチクラ層の断面構造を TEM によって観察した (Fig. 20)。葉の表面では、外側の電子密度の薄い領域「cuticle proper」が野生型と抑制系統の間で差異がみられない (Fig. 20a-d, 黒矢印) 一方、内側の電子密度が高いクチクラ層では、野生型よりも抑制系統のほうが薄くなっていた (Fig. 20a-d, 白矢印)。しかし、葉の裏側においては、cuticle proper, クチクラ層ともに野生型と発現抑制系統で差異は見られなかった (Fig. 20e-h, 白矢印、黒矢印)。

CD2 遺伝子発現抑制系統の葉のクチクラ層における変異が水の透過性に影響していることを検証するため、蒸散量の測定と TB テストを実施した。蒸散量を測定する前に気孔の閉鎖を誘導するために ABA による処理を行った。蒸散量を野生型の Micro-Tom と *CD2* 遺伝子発現抑制系統で比較したところ、発現抑制系統の蒸散量は Micro-Tom よりも有意に多かった (Fig. 21a)。更に、TB テストを行ったところ、Micro-Tom は全く染色されなかった一方、発現抑制系統の葉は容易に TB によって染色された (Fig. 21b)。このことから、発現抑制系統では、外部の水もまた容易に内部組織に浸透することが明らかになった。これらの結果から、*CD2* 遺伝子発現抑制系統では、葉のクチクラ層の水分透過性が上昇しているといえる。

CD2 遺伝子発現抑制系統の水利用効率

表皮の水分透過性が上昇することで、光合成やガス交換が影響を受ける可能性が示唆されたため、LI-6400XT を用いて、光合成速度と水利用効率の測定を行った。興味深いことに、光合成有効光量子束密度 (PPFD) が 0 から $1,500\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の範囲では、Micro-Tom と CD2 遺伝子発現抑制系統の間で光合成速度に差異は見られなかった (Fig. 22a)。このことから、CD2 遺伝子の発現抑制は光合成能力に影響を与えないことがわかった。しかし、CD2 遺伝子発現抑制系統では、蒸散速度が有意に高まっていた (Fig. 22b)。それゆえ、水利用効率は CD2 遺伝子発現抑制系統で低下していた (Fig. 22c)。なお、気孔の密度は、CD2 遺伝子発現抑制系統で有意に低かった (Fig. 23)。

CD2 遺伝子発現抑制系統における果実の表現型

CD2 遺伝子発現抑制系統の果実は、Micro-Tom と比較して、光沢があり、淡い赤色をしていた (Fig. 24a)。加えて、抑制系統では、果実のクチクラ層が薄くなっていた (Fig. 24b-e)。葉では、CD2 遺伝子の発現抑制によって、水の透過性が向上する表現型が観察された。そこで、果実においても水の透過性について評価を行った。その結果、CD2 遺伝子発現抑制系統 AS17 の果実の蒸散量は Micro-Tom と差が無かった (Fig. 25a)。同様に抑制系統 AS16 は、最終的な蒸散量が Micro-Tom と差がなかった (Fig. 25a)。これらの結果は、葉で得られた結果 (Fig. 21a) とは異なる傾向を示していた。また、緑熟果を用いて TB テストを行ったところ、CD2 遺伝子発現抑制系統のみ、スポット状に TB が果実組織内に浸透していることがわかった (Fig. 25b)。

2-4 考察

本章では、*pe lg* 形質の原因となっている遺伝子の同定を試みた。絞り込まれた領域は、第 1 染色体長腕の 462.3 kb 以内の領域であった (Fig. 16)。当該領域はクチクラ層の形成に深く関与している *CD2* 遺伝子を含んでいたため、*CD2* 遺伝子領域のゲノム配列を解析した。その結果、Nadakuduti (2012) が報告したように、*pe lg* 変異体の *CD2* 遺伝子の翻訳領域に、フレームシフトを引き起こす 1 bp の挿入が確認できた。そこで、野生型の Micro-Tom で、*CD2* 遺伝子の発現抑制システムを作出し (Fig. 18)、*pe lg* 形質を再現できるかの検証を行った。*CD2* 遺伝子発現抑制システムは、葉において、蒸散量、水分浸透性が、果実において水分浸透性が上昇していた (Fig. 21a; Fig. 25a)。水の透過性が上昇する表現型は、*cd2*, *pe lg* 変異体双方でも同様に確認されている (Isaacson et al, 2009; Kimbara et al, 2012; Nadakuduti et al, 2012)。*CD2* 遺伝子発現抑制システムは、野生型の Micro-Tom よりもわずかに気孔の数が少なかった (Fig. 23)。このため、抑制システムでは、クチクラ蒸散が Micro-Tom よりも多いと言える。それゆえに、抑制システムの水利用効率は低くなっていた (Fig. 22c)。しかし、光合成能力は抑制システムと野生型システムで差異は見られなかった。これは Micro-Tom の遺伝的バックグラウンドにおいては、葉面積に対する根の量が十分であり、根からの水分供給が、抑制システムにおいても充足しているためであると考えられる (Fig. 18c)。

CD2 遺伝子発現抑制システムの果実は表面に光沢があり、クチクラ層が薄くなっていた。これは、これまでの *cd2*, *pe lg* 変異体が示す表現型と一致している (Isaacson, et al, 2009; Kimbara et al, 2012; Nadakuduti et al, 2012)。しかし、果実外観色が淡い赤色になることは、今までの変異体の解析では報告されていない。このような違いが観察された理由は不明であるが、今回供試した *CD2* 遺伝子発現抑制システムは、特に抑制効果の強いものを解析に用いたため、表現型に差が出た可能性がある。

CD2 遺伝子発現抑制系統の葉は淡緑色であった (Fig. 18b)。これは *pe lg* 変異体の表現型と同じであり、クロロフィル含量に違いは見られないため (Fig. 19)、アントシアニンの欠失である可能性が高い (Nadakuduti et al, 2012)。また、*pe lg* 変異体と同様に、発現抑制系統の葉の表側ではクチクラ層の密度が薄くなっており、*CD2* 遺伝子を抑制することで、適切なクチクラ層形成がなされなかったことが示唆された。一方、葉の裏側については、抑制系統において明確な表現型がみられなかった。このことについては、現段階では明確な考察をすることができていないため、今後、葉の表側と裏側でクチクラ層の構造や組成を解析する必要がある。更に、*CD2* 遺伝子の変異、あるいは発現抑制は、外部の水が極めて容易に果実内に浸透するという表現型を示したが、一方で、蒸散量については、野生型と同等か、それをやや上回るレベルであった (Fig. 25)。これらの結果は、*CD2* 遺伝子の機能を阻害することによる水分透過性への影響は、器官や組織によって異なるということを示唆している。今後、*CD2* 遺伝子がクチクラ層に対して構造的、生理的にどのように寄与しているのか、またクチクラ層形成にどのように寄与しているのか、明らかにする必要がある。

Table 3 ラフマッピングに用いたマーカー

Marker	ID	Map Position (cM)	Genomic Location	Forward Sequence	Reverse Sequence	Anealing Temperature	Restriction Enzyme
C2_At2g38730	SGN-M4700	92.5 cM	SL2.40ch01 79361300..79366355	AGCGGACCAAACTAATGGATG	AGCCACATTCTCAATCTCTGAC	55	<i>Alu I</i>
C2_At3g04710	SGN-M7614	95.0 cM	SL2.40ch01 79886766..79897350	AGGGTGCAGATCCTGCAATACCCAG	GAAGTTCAAGTTGTAAATATTGGCCAT	55	Amplicon
SSR222	SGN-M895	97.5 cM		TCTCATCTGGTGCTGCTGTT	TTCTTGGAGGACCCAGAAAC	55	Amplicon

ID は SGN データベースにおけるマーカーの ID を示す。Map position は、EXPEN2000 より引用した染色体の遺伝距離の数値を適用している。Genomic location は、マーカーが座乗する物理位置を示している。Anealing temperature は PCR を行う際のアニーリング温度、Restriction enzyme は増幅断片を記載されている制限酵素で切断することで多型の検出が可能であることを示している。Amplicon は増幅 DNA 断片サイズの差で多型が検出可能であることを示す。

Table 4 ファインマッピングに用いたマーカー

Marker	ID	Map Position (cM)	Genomic Location	Forward Sequence	Reverse Sequence	Anealing Temperature	Restriction Enzyme
C2_At2g45200	SGN-M7525	92.5 cM	SL2.40ch01 76487073..76494466	TCTAAGGATCTGAGTATGGAGATACTGC	ATCTAAAGTTGGGAACCACTTCT	65	<i>Taq I</i>
C2_At3g60740	SGN-M8106	95.0 cM	SL2.40ch01 76562622..76563518	ATTATGCAAAATCTTTGAAGAACC	GATAACCCCTGAAGAAAGAGATGTTGA	55	<i>Pst I</i>
C2_At4g00090	SGN-M8138	97.5 cM	SL2.40ch01 76711370..76720744	AGATATTGGCCACCACTCATGGTTC	AGGCGACCATGCCATGTCCG	65	<i>Dpn II</i> <i>Bst YI</i>
C2_At1g48050	SGN-M6818	58.0 cM	SL2.40ch01 76756682..76759060	TGAAAGAGGAAATAGGAGGATATGAAC	ATCGTGACTGGCGATATATTACGAG	65	<i>Taq I</i>
solcap_snp_sl_100409	-	-	SL2.40ch01 76783782..76783936	TGTGTGAGCAAAATCGTCTCC	TTCTTCTCAACTTGTAGGATTC	60	Sequencing
Solyc01g091500_1	-	-	SL2.40ch01 76904908..76889107	TGCTGTTGTGGACCATCATGAG	GGTATGATTGAGAAACTGACTCCT	60	<i>Dra I</i>
C2_At1g65520	SGN-M6963	62.1 cM	SL2.40ch01 76888730..76905911	CAGAAACTCCGATGTCTCGCCT CATGACTACATCTTGATGCGCAGAG	TCCCAATTCGTCTACCAATCTTCA	55	Amplicon
C2_At3g61140	SGN-M8141	62.5 cM	SL2.40ch01 77007283..77009949	AGCCGACGAGATCTACGCCAACG	AACATAATCTTAAATGCCTCTCCAAG	60	<i>Hae III</i>
Solyc01g091720_1	-	-	SL2.40ch01 77078822..77079332	CAGAGATGTGACATTGACAACTTG	CGTCTCTGACTTTCACATAGTC	60	<i>Sca I</i>
C2_At2g45670	SGN-M7533	68.7 cM	SL2.31ch01 77246071..77256394	ACTGGACATGCTGTGCAACTGC	GTTTCAGTCTTAAGACCTTGAGGAAG	60	<i>Taq I</i>
C2_At2g45620	SGN-M7531	69.2 cM	SL2.40ch01 77331455..77336439	AAGGATGTTCAAGGAATGCCTGG	CATATGTGCAAGATATCCAGTT	65	<i>Dra I</i>
C2_At2g45910	SGN-M7538	73.0 cM	SL2.40ch01 77870564..77872958	ATATCTAAAAGCCAGTCATCTGTCTGT GATATCTTCATGCTCAGTGGTATAT	AGTGCAGGAATGGAGGAAGATGAGAGC	55	Amplicon

ID は SGN データベースにおけるマーカーの ID を示す。Map position は、EXPEN2000 より引用した染色体の遺伝距離の数値を適用している。Genomic location は、マーカーが座乗する物理位置を示している。Anealing temperature は PCR を行う際のアニーリング温度、Restriction enzyme は増幅断片を記載されている制限酵素で切断することで多型の検出が可能であることを示している。Amplicon は増幅 DNA 断片サイズの差で多型が検出可能であることを示す。

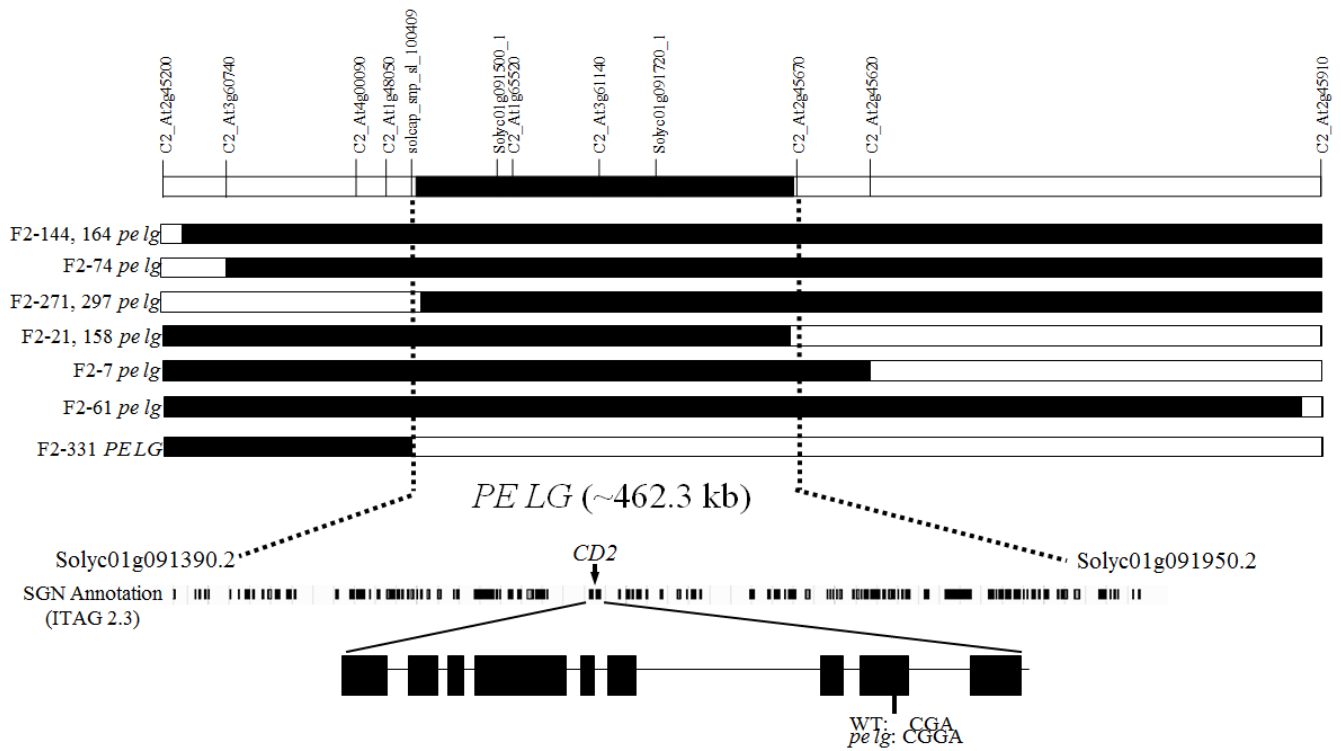


Fig. 16 *pe lg* 遺伝子のファインマッピング

pe lg のファインマッピングは地図上に示されている 12 個のマーカーで行った。それぞれの組み換え体の各マーカーにおける遺伝子型は白 (*S. pennellii*) と黒 (*S. lycopersicum*) で示している。

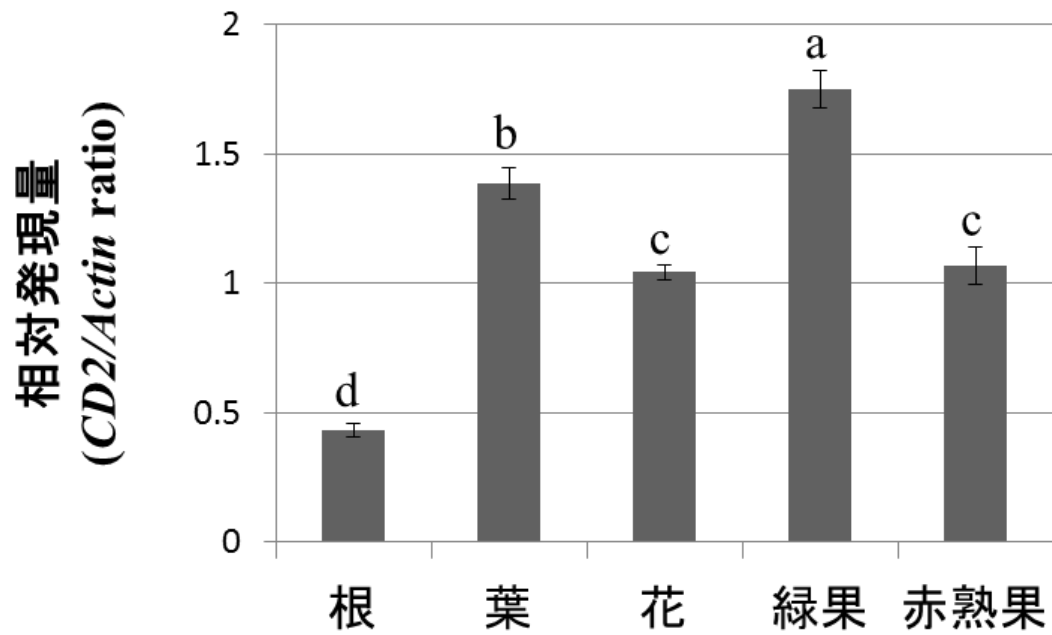


Fig. 17 植物体組織における CD2 遺伝子の発現量

全 RNA から合成された cDNA を鋳型として、*Actin* および *CD2* 遺伝子を増幅した。*CD2* 遺伝子の発現レベルは、*Actin* 遺伝子と比較した相対的な値で示している。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 3$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

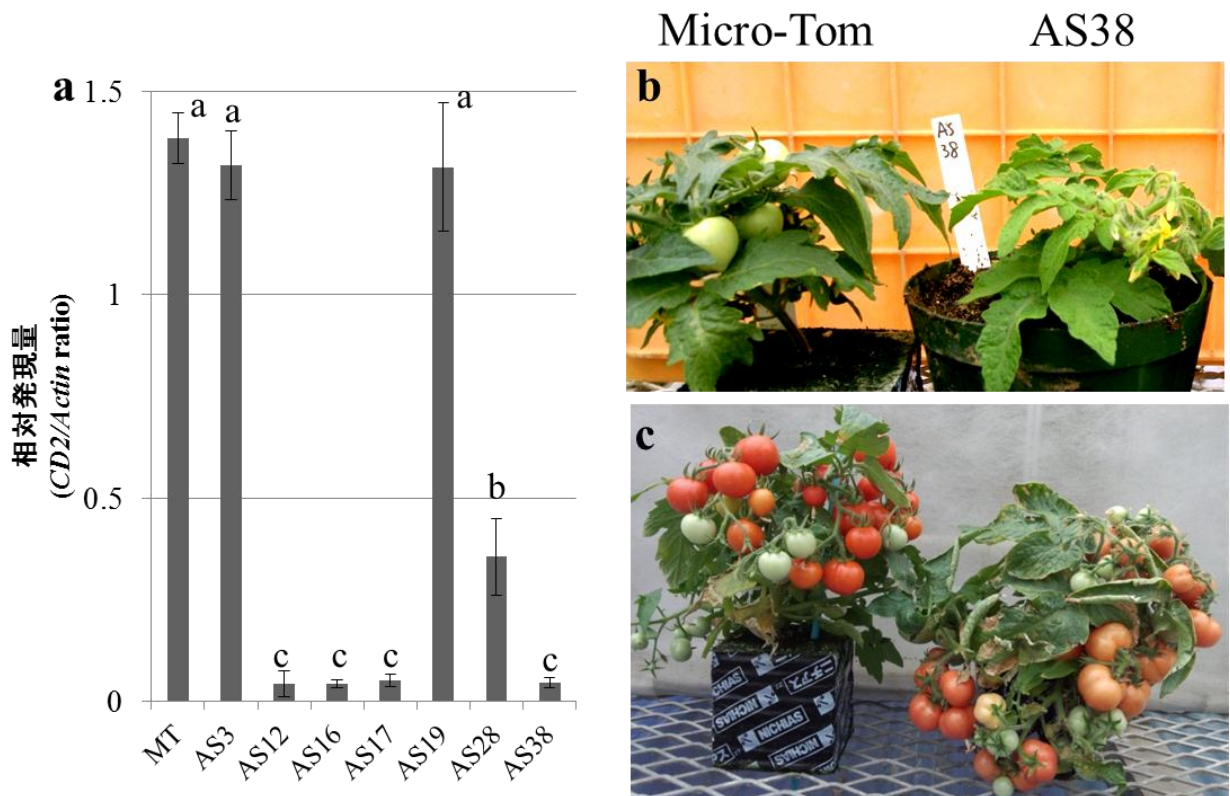


Fig. 18 CD2 遺伝子発現抑制系統の作出

(a) CD2 遺伝子発現抑制系統における CD2 遺伝子の発現レベル。CD2 遺伝子の発現レベルは Actin 遺伝子の発現量と比較した相対値で示した。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 3$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す (ANOVA 及び; $p < 0.05$)。 (b) 苗および (c) 成熟期の Micro-Tom および CD2 遺伝子発現抑制系統。左が Micro-Tom で右が抑制系統 AS38 である。

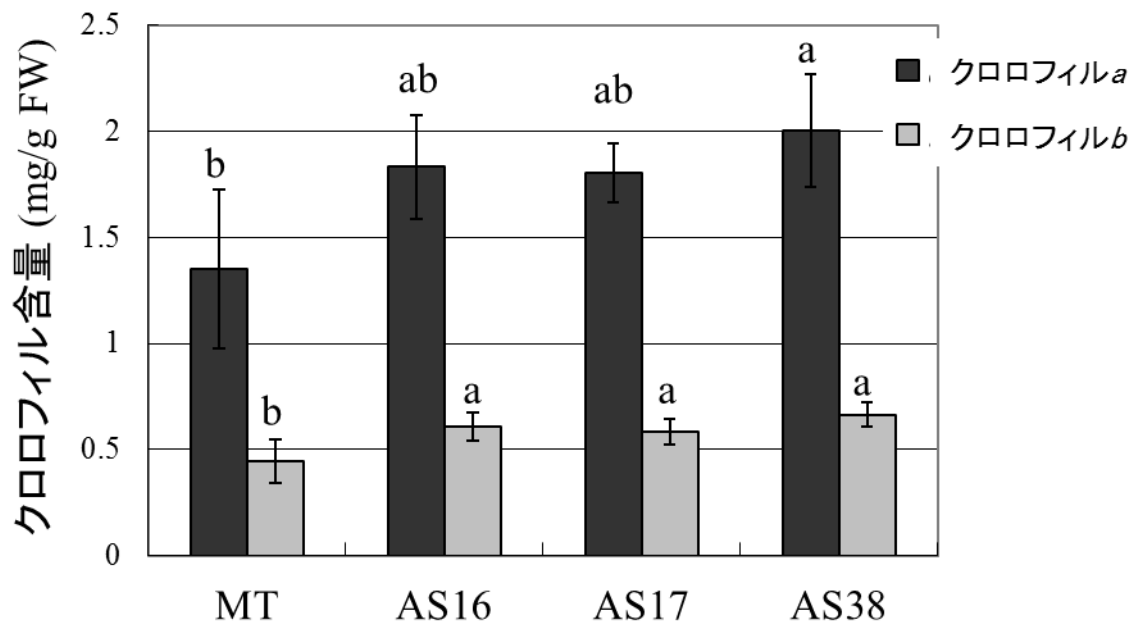


Fig. 19 Mico-Tom および CD2 遺伝子発現抑制系統のクロロフィル含量
 垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

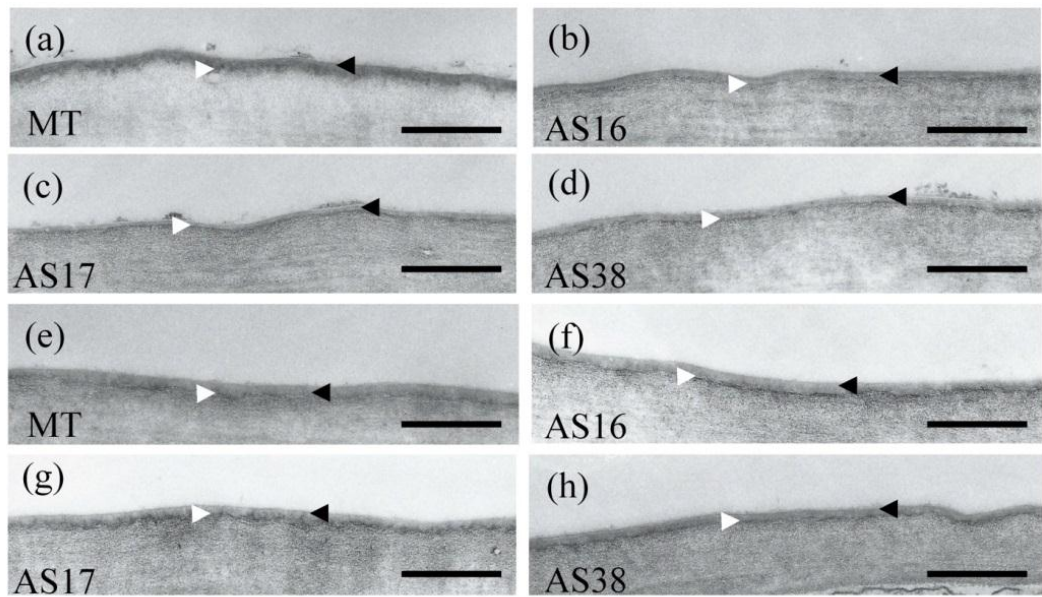


Fig. 20 Micro-Tom および *CD2* 遺伝子発現抑制系統の葉の表皮断面
 (a-d)葉の表面の表皮断面。(e-h)葉の裏面の表皮断面。Cuticle proper は黒矢印、クチクラ層は白矢印で示している。スケールバーは 500 nm を示している。

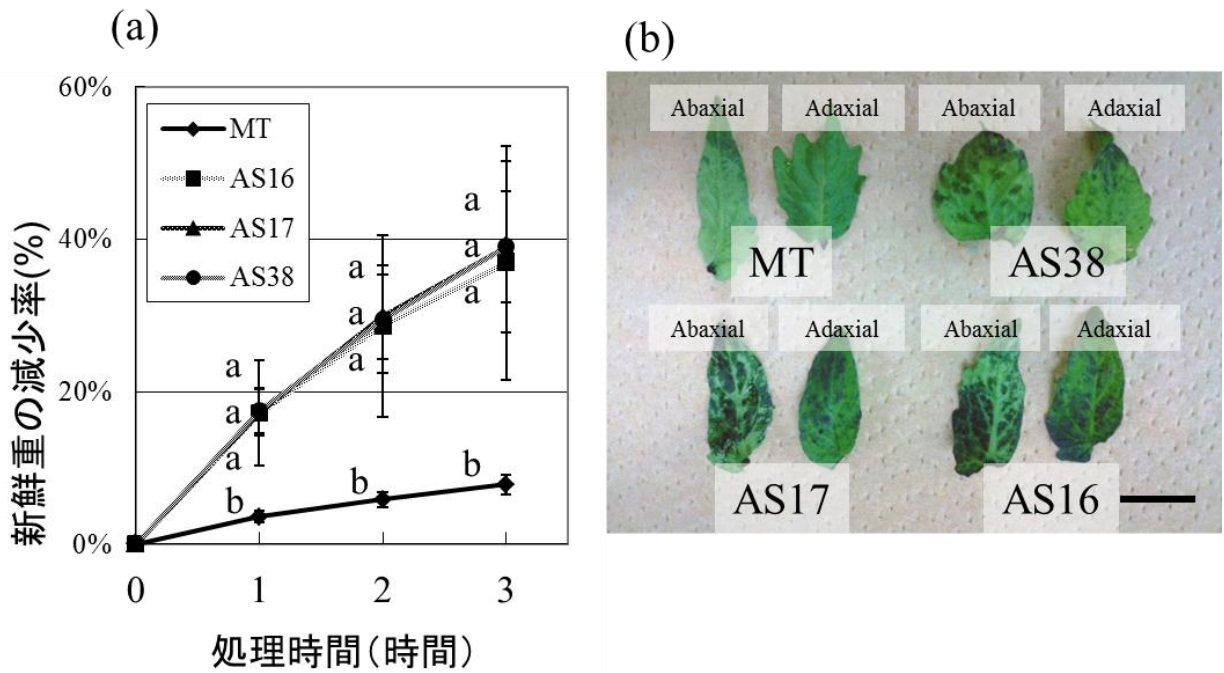


Fig. 21 葉の水分透過性

(a)Micro-Tom と *CD2* 遺伝子発現抑制系統における新鮮重の減少率。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。検定は時間ごとに行い、異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。
 (b)Micro-Tom と *CD2* 遺伝子発現抑制系統の TB 水溶液による染色パターン。各系統の右側が表面、左側が裏面を示している。スケールバーは 1 cm である。

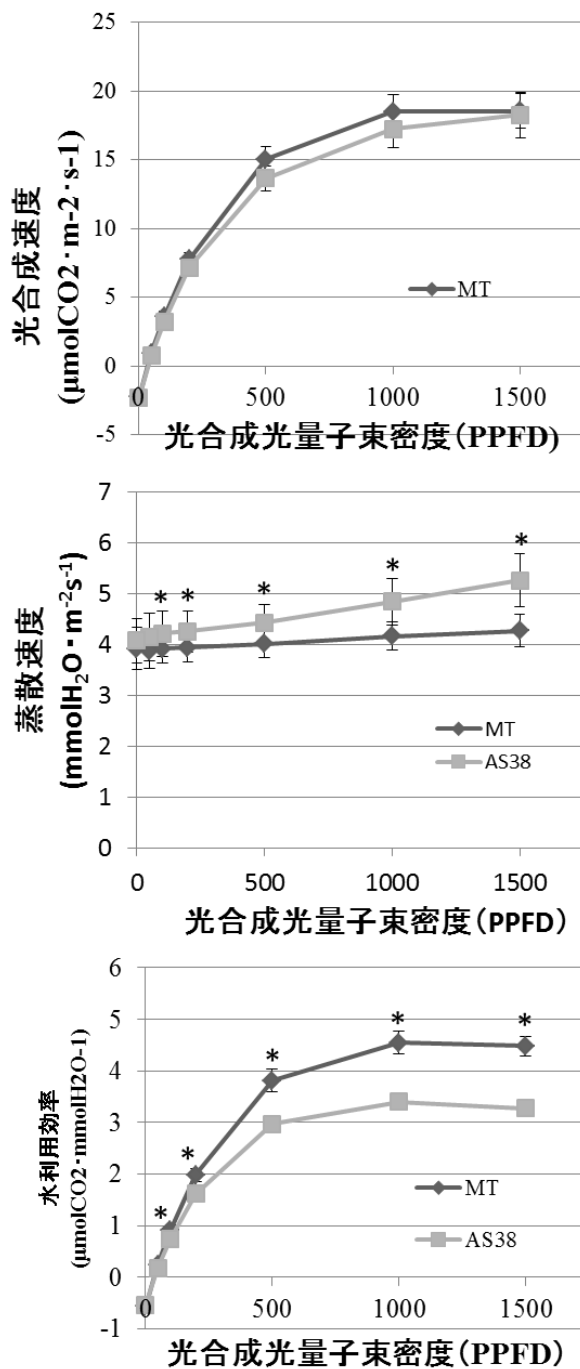


Fig. 22 光合成能力および水利用効率

野生型系統と *CD2* 遺伝子発現抑制系統の(a)光合成速度 (b)蒸散速度 (c)水利用効率。野生型系統として Micro-Tom、*CD2* 遺伝子発現抑制系統として AS38 を用いた。垂直の線は標準偏差を示す($n = 5$)。アスタリスクは差が t 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

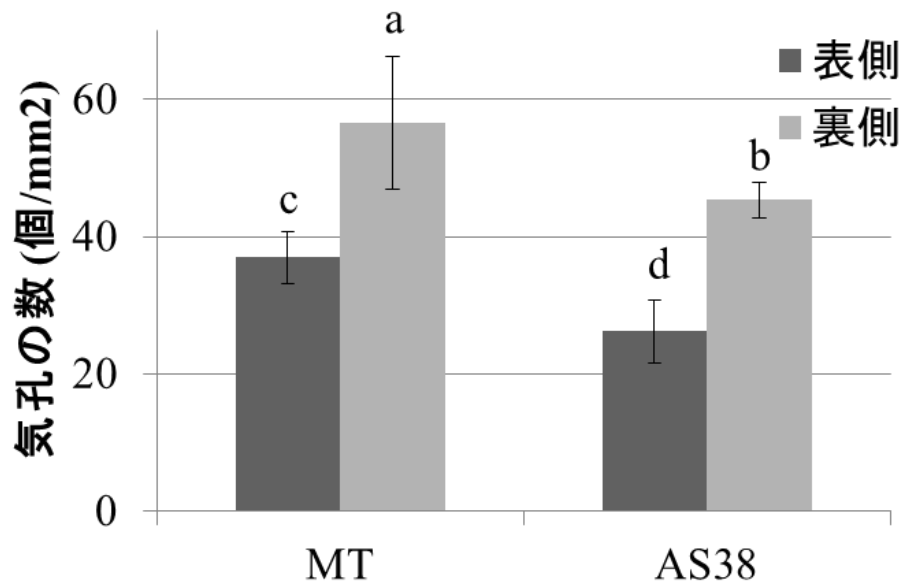


Fig. 23 Micro-Tom と *CD2* 遺伝子発現抑制系統 AS38 の気孔密度
 垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。異なるアルファベットは差が Tukey
 HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。

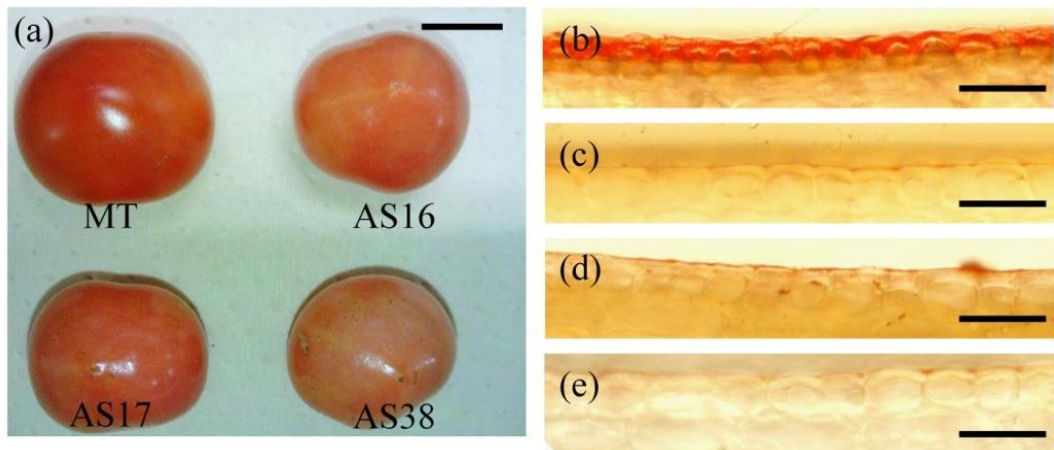


Fig. 24 Micro-Tom および *CD2* 遺伝子発現抑制系統の赤熟果

(a) Micro-Tom および *CD2* 遺伝子発現抑制系統 (AS16, AS17, AS38) の果実外観。(b) Micro-Tom と抑制系統の果皮断面。スケールバーは(a) 1 cm および(b) 50 μ m を示している。

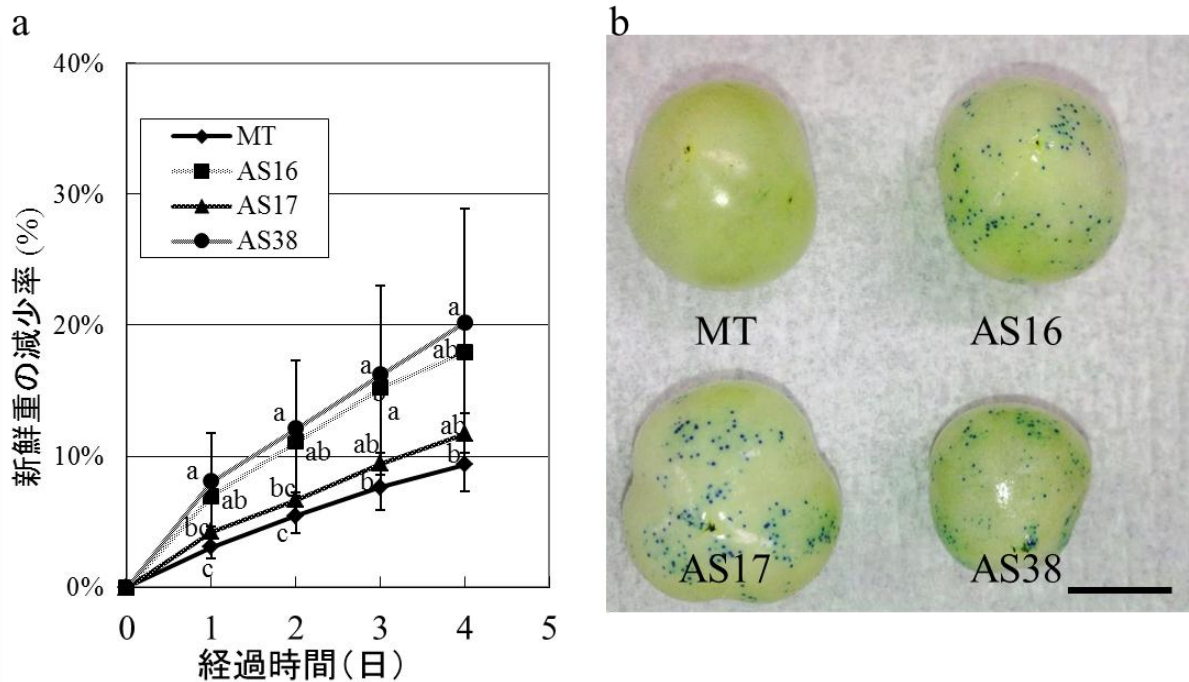


Fig. 25 Micro-TomとCD2遺伝子発現抑制系統の果実における水分透過性

(a) Micro-Tom および抑制系統 (AS16, AS17, AS38) の果実における新鮮重の減少率。垂直の線は標準偏差を示す ($n = 5$)。検定は時間ごとに行い、異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定により有意水準 5% で有意であることを示す。(b) Micro-Tom および抑制系統 (AS16, AS17, AS38) の果実の TB 水溶液による染色パターン。スケールバーは 1 cm を示している。

第 3 章 CD2 遺伝子の変異が果実代謝産物に与える影響

3-1 緒言

第 1 章で、トマト *pe lg* 変異体は葉および果実のクチクラ層に異常が生じていることを明らかにした。更に、第 2 章ではこの *pe lg* 形質が、*CD2* 遺伝子領域における 1 塩基挿入により引き起こされていること、*CD2* 遺伝子の発現を抑制することで *pe lg* 形質が再現されたことを報告した。*CD2* 遺伝子の変異・抑制によって引き起こされる主な表現型は、葉および果実の水分透過性上昇、およびクチクラ層の著しい減少であった。このクチクラ層の減少については、クチン、ワックスの量、組成の変化に関する研究がなされている。*cd2* 変異体の果実においては、クチンを構成する主な成分である 10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸が、野生型と比較して著しく減少していたことに加え、ワックスにおいてはアルカンが増加していた (Isaacson et al, 2009)。また、*pe* 変異体でも同様に 10, 16-ジヒドロキシヘキサデカン酸の減少が確認された上、それ以外の脂肪酸、フェニルプロパノイド、アルカンについても組成、量が変化していることが報告された (Nadakuduti et al, 2012)。第 1 章で得られた結果より、*pe lg* 変異体のワックス画分の total ion chromatogram (TIC) は、野生型の系統と比較して大きな差異は見られない一方、クチン画分については、TIC のパターンについて、大きな違いがみられることが明らかである。これらの結果より、*CD2* 遺伝子は、正常なクチクラ層形成、特にクチンの生合成に対して重要な機能を担っていると考えられる。

一方、*CD2* 遺伝子の変異は葉と果実のクチクラ層形成に影響があることは明らかだが、表皮以外の組織における表現型については、これまで解析された例がない。ワックス、クチンを構成する成分は表皮細胞の小胞体で脂肪酸から合成され、細胞壁を通り抜けて植物体表へと沈着

されていく。このため *cd2*, *pe lg* 変異体で観察されたクチン、ワックス構成成分の減少、組成変化は、植物体の脂質、ひいては炭素の代謝フラックスに影響を与える可能性が高く、それゆえに表皮以外の組織においても、代謝産物組成の変化が起こっている可能性が考えられる。

トマトの果実は、メタボローム研究のモデル材料の一つであり、一次代謝産物、二次代謝産物の組成について、多くの知見が存在するため、この研究に最適な材料である。そこで、本章では、*pe lg* 変異がトマトの果実成分にどのような影響を与えているか調査するため、代謝産物の網羅的分析を行った。

3-2 材料および方法

植物材料

第 1 章で用いた栽培種トマト (*Solanum lycopersicum*) の *pe lg* 変異体 KGM942、野生型系統 K091, RC17, Ec-1 を以降の分析に供試した。植物体は温室で栽培し、温度は日中 24-28°C、夜間 14-18°C で維持した。

代謝産物分析

詳細な分析方法については、巻末の Appendix に記載した。ここでは主要なステップのみを記載した。

サンプル調製

サンプルは各系統の異なる植物体から 10 個の果実をサンプリングして、赤熟果の果肉を約 1 g 採取して、ジルコニアビーズ (YTZ ボール φ5 mm、ニッカトー) を入れた 2 ml のチューブに入れ、速やかに液体窒素で凍結させた。サンプルは粉碎後、凍結乾燥を行った。乾燥させたサンプルのうち、2 mg を GC-MS, LC-q-TOF-MS 分析へ供試した。また、7.5 mg を脂質分析、HPLC へ供試した。

GC-MS 向けサンプル調製

乾燥させたサンプルは、1 ml の抽出バッファー(メタノール:クロロホルム:水=3:1:1)中で振とうし、遠心分離して上清を新しいチューブに移動させ、乾固させた。その後、*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA)にて誘導体化させた。

LC-MS 向けサンプル調製

乾燥させたサンプルは、30 倍量の抽出バッファー(メタノール:水=2:5)中で振とうし、遠心分離して上清を新しいチューブに移動させ、更に 30 倍量のメタノールを残渣の入ったチューブに加え、抽出を行った。抽出されたサンプルは、乾固させた後、20 %メタノールに溶解させた。

脂質およびカロテノイド分析向けサンプル調製

乾燥させたサンプルは、1238 μ l の抽出バッファー(クロロホルム:メタノール=1:2、0.1 %ジブチルヒドロキシトルエン)中で振とうし、遠心分離して上清を新しいチューブに移動させ、更に 526 μ l の 50 %クロロホルム水溶液を添加してインキュベートした。サンプル溶液は遠心分離し、有機層を採取して乾固させ、次いでクロロホルム:エタノール=1:1の溶液(ジブチルヒドロキシトルエン含む)に溶解させた。

分析条件

GC-TOF-MS, LC-q-TOF-MS, HPLC の分析条件については、末尾の Appendix に詳細を記載した。

データ処理

GC-TOF-MS, LC-q-TOF-MS, HPLC から得られたデータの処理方法については、末尾の Appendix に詳細を記載した。得られたデータは、MetMask (Redestig et al, 2009)を用いて統合した。全てのデータは、以降の解析に用いる前に、そのデータ分布を補正し、正規分布として扱えるように \log_2 あるいは \log_{10} 変換させた。主成分分析 (principal component analysis, PCA) は、SIMCA-P+ 13.0 (Umetrics AB, Sweden)を用いて \log_{10} 変換したデータを用いて、観測数 40 サンプル、変数 2,527 ピークの条件にて行った。群間の平均値の比較は、分散分析 (ANOVA)、次いで Tukey HSD 法にて多重比較 ($p < 0.05$) を行った。数値データは平均値および標準偏差 (SD) を示した。

3-3 結果

野生型系統と比較して、*cd2* 変異体では果実において、脂質からなるクチクラ層構成成分の量と組成が変化していることが知られている。このため、*cd2* 変異体では、脂質代謝をはじめとする果実内の代謝産物の量・組成もまた変化している可能性がある。そこで、これまでに多くの知見の蓄積があるトマト赤熟果の果肉を用いて、脂質、フラボノイド、グリコアルカロイド、カロテノイド、その他の一次代謝物のメタボライトプロファイリングを行った。供試した品種は *CD2* 遺伝子に変異のある KGM942, 野生型系統である Ec-1, RC17, K091 である。野生型系統の生理的特徴については、本論文の第 1 章を参照されたい。なお、今回の分析はターゲット分析ではないため、得られたピークの大きさから実際の含有量を算出することはできない。しかし、同一代謝産物の系統間の差については比較が可能である。

まず全体の傾向を把握するため、主成分分析 (PCA) を行った。観測値 (Observations) は 4 系統から各 10 サンプルを分析したので合計 40

個、変数(Variables)は未同定の化合物も含む全てのピーク 2,527 個である。得られた結果をもとに、第 1 主成分と第 2 主成分におけるサンプルの分布を可視化した(Fig. 26)。同一系統内のばらつきは少なく、それぞれの系統間に明確な差がみられた。*cd2* 変異体と野生型 3 系統は、第 1 主成分(寄与率 0.244)上で分離した。また、第 2 主成分(寄与率 0.127)上で、野生型の 3 系統がそれぞれ分離した。今回供試した系統は遺伝的背景を統一できなかったが、この結果より *cd2* 遺伝子の変異が、果実の代謝産物に特有の変化を起こしうる、ということが示唆された。また、野生型の 3 系統は、遺伝的バックグラウンドに起因する代謝産物プロファイルの違いがあるものの、*cd2* 変異体と野生型 3 系統との違いを解析することで、*cd2* 変異体に特有の変異を解析できると考えた。

最初に脂質関連の代謝産物の分析結果を示す(Table 5)。同定された代謝産物のうち、脂肪酸、ジアシルグリセロール(DAG)34:3、DAG 36:5を除くアシルグリセロールについては、野生型系統の間で、遺伝的背景に起因する差異がみられるものがあるものの、*cd2* 変異体と野生型 3 系統の間で平均値に有意差のある化合物はみられなかった。一方、糖脂質に関しては、Campesterol (6'-*O*-palmitoyl) glucoside、beta-Sitosterol (6'-*O*-linoleoyl) glucoside、同定された全てのモノガラクトシルジアシルグリセロール(MGDG)、ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)が *cd2* 変異体で有意に増加していた。リン脂質においては、リゾフォスファチジルコリン(PC) 16:0、フォスファチジルエタノールアミン(PE) 34:2、PE 34:3、フォスファチジルグリセロール(PG) 34:2、フォスファチジルイノシトール(PI) 34:2、PI34:3 が *cd2* 変異体で有意に多かった。

次に、フラボノイドおよびグリコアルカロイドの変化について示す。フラボノイドとグリコアルカロイドは、総じて *cd2* 変異体で多い傾向がみられた(Table 6)。フラボノイドでは配糖体である kaempferol-3-*O*-rutinoside、

naringenin dihexose、quercetin-dihexose-deoxyhexose, ルチンの増加がみられた。一方、トマトの果皮に豊富に含まれるナリンゲニン・ナリンゲニンカルコン (Adato et al, 2009; Ballester et al, 2010) については、*y* 変異を有する K091 では少なかったものの、他の野生型系統と *cd2* 変異体間で差異は見られなかった。グリコアルカロイドにおいては、トマチン、エスクレオシドおよびその派生物が増加していた。興味深いことに、グリコアルカロイドにおいても、増加した化合物は、トマチジン以外は全て配糖体の構造をとっていた。

脂質、フラボノイド、グリコアルカロイドの分析結果より、*cd2* 変異体で有意に増加している代謝産物は、配糖体の構造をとるものが大多数であることが明らかになった。このため、次に糖および糖酸、糖アルコールといった糖関連の代謝産物について解析を行った (Table 7)。その結果、糖では、アセチルグルコサミン、アラビノース、キシロースの含量が *cd2* 変異体で有意に高かった。一方、果実の固形分のうち、大部分を占めるフルクトース、グルコースについては *cd2* 変異体と野生型系統で差異は見られなかった。糖酸、糖アルコールについては、*cd2* 変異体は野生型系統と比較して、ガラクトuron酸、glucuronic acid-*e*-lactone、サッカリン酸、ガラクチノールが有意に多い一方、グリセリン酸、*myo*-イノシトールは少なかった。次いでカロテノイドの分析を示す (Table 8)。今回の分析では、 β -カロテンおよびリコピンが検出された。この中で、リコピンは *cd2* 変異体において野生型系統よりもやや含量が高かった。

次に、アミノ酸および有機酸の測定結果を示す (Table 9)。興味深いことに、アミノ酸含量は、野生型品種間で遺伝的バックグラウンドに起因する差はあるものの、*cd2* 変異体に特有の差異は見られなかった。有機酸については、*cd2* 変異体は野生型系統と比較して、トランスシナピン酸が有意に多い一方、 α -ケトグルタル酸は少なかった。アミノ酸、有機酸については、脂質や糖関連の代謝産物と比較すると、*CD2* 遺伝子の

変異による影響は少なかった。また、それ以外の同定された代謝産物については、プトレシン、トリプトアミン、プラストキノンといった代謝産物に *cd2* 変異体に特異的と考えられる差異がみられた (Table 10)。

3-4 考察

第 1 章、第 2 章における組織学的、生理学的な解析により、*cd2* 変異体のクチクラ層には著しい変化が起きていることが明らかになった。これまでの研究で、*cd2* 変異体の果実では、野生型系統と比較して、クチンの量・組成が大幅に、ワックスの量・組成がわずかに変化していることが報告されている (Isaacson et al, 2009; Nadakuduti et al, 2012)。これらの結果から、その他の脂質代謝産物もまた、変異体の果実において量・組成が変化している可能性が考えられる。このことを検証するため、*cd2* 変異体と3つの野生型系統を用いて、果実のメタボライトプロファイリングを行った。その結果、脂質および糖関連の代謝産物に *cd2* 変異体に顕著な違いを見出した。

cd2 変異体の果実におけるガラクト脂質の増加 (Table 5) は、本来クチン、ワックスといった脂質が蓄積するはずのクチクラ層が薄くなったことに起因する可能性がある。特に MGDG は、DAG と UDP-ガラクトース、DGDG は MGDG と UDP-ガラクトースから合成され、SQDG は DAG と UDP スルホキノボースから合成されるため (Ohta et al, 1997)、*cd2* 変異体では、DAG 以下、これら経路に多くの代謝産物が流入している可能性を示唆する。同様に、一部のリン脂質についても変異体で増加している傾向がみられた (Table 5)。別の可能性として、変異体におけるガラクト脂質の増加は、糖代謝の変化に起因するものである可能性もある。このことを裏付けるように、アラビノース、キシロース、glucuronic acid-*l*-lactone、サッカリン酸、ガラクチノール、ガラクトツロン酸といった糖および糖関連代謝産物が、変異体では増加していた (Table 7)。

更に、変異体ではフラボノイド配糖体である kaempferol-3-*O*-rutinoside、naringenin dihexose、quercetin-dihexose-deoxyhexose, ルチンの増加がみられた (Table 6)。フラボノイドはシキミ酸経路より合成されるため、脂肪酸とは独立して生合成される。このため、変異体におけるフラボノイド配糖体の増加は前述した脂質代謝の変化に起因する可能性は低い。一方、クチクラ層の構造変化そのものが、フラボノイド組成に影響を及ぼしている可能性もある。野生型系統と比較して、*cd2* 変異体で比較的多く含まれるフラボノイド配糖体は、フラボノイド生合成経路の下流に位置している (Slimestad et al, 2009)。一般的に、トマト果実におけるフラボノイドは果皮に存在するナリンゲニン、ナリンゲニンカルコンであり、果肉には少量のルチンが存在するのみである (Muir et al, 2001; Bovy et al, 2002; Verhoeyen et al, 2002)。しかし、*cd2* 変異体の果皮におけるナリンゲニンの含量は、野生型系統よりも大幅に低かった (Kimbara et al, 2012)。このことから、*cd2* 変異体の果実では、クチクラ層が十分な量のナリンゲニンカルコンを蓄積するには薄く、本来クチクラ層にロードされるはずであった余剰のナリンゲニンカルコンが下流の代謝産物へ変化している可能性があることを示唆している。あるいは、*CD2* 遺伝子そのものが、フラボノイド生合成遺伝子を直接制御している可能性もある。このことを裏付けるように、シロイヌナズナでは *CD2* 遺伝子のオーソログである *ANTHOCYANINLESS (ANL) 2* 遺伝子は、葉におけるアントシアニン蓄積と関係があることが報告されている (Kubo et al, 1999)。

トマチンやエスクレオシドといったグリコアルカロイドもまた *cd2* 変異体において野生型系統より多く含まれていた (Table 6)。*cd2* 変異体で増加していたフラボノイド同様、グリコアルカロイドは配糖体化されているため、前述した糖代謝の変化がこの表現型の要因の一因であると考えられる。それでもなお、グリコアルカロイドが変異体で大幅に増加する原因は不明である。近年、グリコアルカロイドは主に果皮に蓄積するという

報告がなされた(Mintz-Oron et al, 2008)。よって、変異体におけるグリコアルカロイドは、クチクラ層の構造的な変化と関係があると考えられる。

一方、果実の固形分のうち、25%を占めるフルクトース、22%を占めるグルコース、10%以上を占めるアミノ酸及び有機酸(Davies and Hobson, 1981)、その他の代謝産物については、*cd2* 変異体と野生型系統で顕著な傾向の違いは見られなかった(Table 9, 10)。このため、脂質、フラボノイド、グリコアルカロイド、糖関連の代謝産物における差異は、*cd2* 変異体に特有のものであると考えられる。

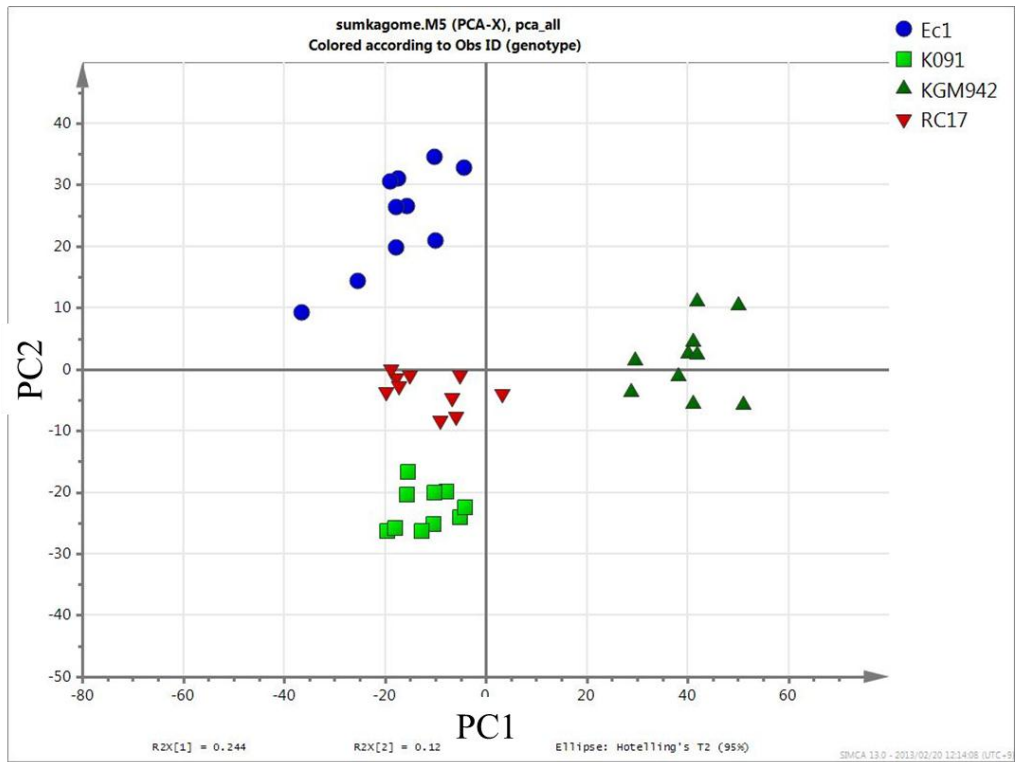


Fig. 26 代謝産物プロファイルから得られた PCA スコアの散布図
 それぞれの点は個々のサンプルを示す。青い丸は Ec-1、緑の四角は K091、赤い三角は RC17、緑の三角は KGM942 を示す。

Table 5 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉における脂質組成

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) \pm SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
Fatty acids					
Linoleic acid	GC	31.21 \pm 0.78 a	30.74 \pm 0.89 a	30.26 \pm 0.47 a	30.95 \pm 0.50 a
Palmitic acid	GC	25.30 \pm 0.95 a	24.94 \pm 1.13 a	24.39 \pm 0.64 a	25.10 \pm 0.66 a
Acyl glycerols					
DAG_34:2	LC1	-2.38 \pm 0.14 b	-2.66 \pm 0.14 a	-2.39 \pm 0.19 b	-2.25 \pm 0.32 b
DAG_34:3	LC1	-4.29 \pm 0.16 b	-4.08 \pm 0.24 b	-4.61 \pm 0.16 a	-3.70 \pm 0.40 c
DAG_36:4	LC1	-3.71 \pm 0.17 b	-4.25 \pm 0.08 a	-3.92 \pm 0.14 b	-3.92 \pm 0.42 b
DAG_36:5	LC1	-4.95 \pm 0.10 a	-5.01 \pm 0.14 a	-5.22 \pm 0.25 a	-4.61 \pm 0.41 b
TAG_50:2	LC1	-5.06 \pm 0.27 b	-4.98 \pm 0.28 b	-5.83 \pm 0.45 a	-5.25 \pm 0.86 ab
TAG_52:3	LC1	-6.84 \pm 0.36 a	-7.52 \pm 0.52 a	-7.26 \pm 0.45 a	-7.20 \pm 1.24 a
TAG_52:4	LC1	-3.11 \pm 0.33 a	-3.51 \pm 0.32 a	-3.34 \pm 0.59 a	-3.76 \pm 0.97 a
TAG_52:5	LC1	-2.90 \pm 0.26 ab	-2.63 \pm 0.33 b	-3.26 \pm 0.77 ab	-3.63 \pm 0.86 a
TAG_54:6	LC1	-3.50 \pm 0.38 b	-4.38 \pm 0.43 ab	-3.61 \pm 0.63 b	-4.52 \pm 1.18 a
TAG_54:7	LC1	-2.53 \pm 0.22 b	-2.80 \pm 0.37 b	-2.92 \pm 0.73 ab	-3.65 \pm 0.96 a
TAG_54:8	LC1	-3.10 \pm 0.23 b	-3.12 \pm 0.32 b	-3.61 \pm 0.77 ab	-4.05 \pm 0.90 a
Glycolipids					
Campesterol (6'- <i>O</i> -palmitoyl) glucoside	LC1	-4.14 \pm 0.12 a	-3.36 \pm 0.13 c	-3.94 \pm 0.15 b	-3.18 \pm 0.11 d
MGDG_34:3	LC1	-5.28 \pm 0.14 a	-4.09 \pm 0.32 b	-3.94 \pm 0.31 b	-3.48 \pm 0.24 c
MGDG_36:4	LC1	-2.60 \pm 0.21 b	-3.74 \pm 0.42 a	-3.55 \pm 0.35 a	-1.71 \pm 0.58 c
MGDG_36:5	LC1	-2.65 \pm 0.20 b	-3.26 \pm 0.39 a	-3.32 \pm 0.37 a	-1.35 \pm 0.42 c
MGDG_36:6	LC1	-1.80 \pm 0.14 a	-0.94 \pm 0.28 b	-0.48 \pm 0.20 c	0.27 \pm 0.15 d
DGDG_34:1	LC1	-7.03 \pm 0.29 b	-7.85 \pm 0.41 a	-6.51 \pm 0.36 c	-5.75 \pm 0.58 d
DGDG_34:2	LC1	-2.97 \pm 0.15 c	-3.80 \pm 0.34 a	-3.44 \pm 0.24 b	-2.51 \pm 0.37 d
DGDG_34:3	LC1	-4.06 \pm 0.13 a	-3.12 \pm 0.27 b	-2.61 \pm 0.26 c	-1.90 \pm 0.15 d
DGDG_36:3	LC1	-6.15 \pm 0.09 a	-5.79 \pm 0.14 b	-5.43 \pm 0.28 c	-4.11 \pm 0.14 d
DGDG_36:4	LC1	-5.09 \pm 0.21 b	-6.12 \pm 0.31 a	-5.69 \pm 0.22 a	-3.98 \pm 0.64 c
DGDG_36:5	LC1	-4.64 \pm 0.24 b	-5.78 \pm 0.43 a	-5.31 \pm 0.43 a	-3.14 \pm 0.53 c
DGDG_36:6	LC1	-3.65 \pm 0.14 a	-3.16 \pm 0.23 b	-2.53 \pm 0.19 c	-1.19 \pm 0.14 d
beta-Sitosteryl (6'- <i>O</i> -linolenoyl) glucoside	LC1	-4.64 \pm 0.24 a	-4.79 \pm 0.30 a	-3.94 \pm 0.21 b	-3.90 \pm 0.21 b
beta-Sitosteryl (6'-<i>O</i>-linoleoyl) glucoside	LC1	-5.95 \pm 0.15 b	-6.12 \pm 0.20 ab	-6.18 \pm 0.22 a	-4.77 \pm 0.28 c
beta-Sitosteryl (6'- <i>O</i> -palmitoyl) glucoside	LC1	-1.98 \pm 0.16 a	-2.03 \pm 0.25 a	-1.45 \pm 0.13 b	-1.30 \pm 0.15 b
Sitosteryl glucoside	LC1	-4.63 \pm 0.20 a	-4.79 \pm 0.35 a	-4.20 \pm 0.13 b	-4.23 \pm 0.31 b
SQDG_34:3	LC1	-5.65 \pm 0.19 a	-5.20 \pm 0.21 b	-5.20 \pm 0.16 b	-4.34 \pm 0.15 c
Phospholipids					
lysoPC_16:0	LC1	-5.33 \pm 0.29 a	-5.38 \pm 0.19 a	-4.98 \pm 0.21 b	-4.34 \pm 0.20 c
PC_34:1	LC1	-2.08 \pm 0.33 b	-2.28 \pm 0.53 ab	-2.57 \pm 0.24 a	-1.97 \pm 0.40 b
PC_34:2	LC1	1.86 \pm 0.14 a	1.93 \pm 0.10 a	1.96 \pm 0.19 a	2.02 \pm 0.09 a
PC_34:3	LC1	-0.24 \pm 0.15 a	0.59 \pm 0.21 b	-0.21 \pm 0.18 a	0.39 \pm 0.11 b
PC_34:4	LC1	-6.42 \pm 0.16 a	-5.73 \pm 0.18 b	-5.16 \pm 0.38 c	-5.14 \pm 0.33 c
PC_36:2	LC1	-1.78 \pm 0.18 b	-1.99 \pm 0.10 a	-2.12 \pm 0.17 a	-1.72 \pm 0.14 b
PC_36:3	LC1	-2.24 \pm 0.35 a	-2.15 \pm 0.42 a	-1.92 \pm 0.17 ab	-1.65 \pm 0.44 b
PC_36:4	LC1	1.26 \pm 0.18 a	1.34 \pm 0.09 ab	1.47 \pm 0.17 b	1.43 \pm 0.12 ab
PC_36:5	LC1	-0.30 \pm 0.14 a	0.46 \pm 0.19 c	-0.05 \pm 0.16 b	0.31 \pm 0.09 c
PC_36:6	LC1	-3.92 \pm 0.21 a	-2.51 \pm 0.37 c	-3.31 \pm 0.20 b	-2.61 \pm 0.11 c
PE_34:2	LC1	-0.80 \pm 0.10 a	-0.63 \pm 0.09 b	-0.39 \pm 0.14 c	-0.20 \pm 0.10 d
PE_34:3	LC1	-3.19 \pm 0.16 a	-2.51 \pm 0.23 b	-3.16 \pm 0.16 a	-2.41 \pm 0.13 b
PE_36:2	LC1	-5.02 \pm 0.16 a	-4.96 \pm 0.09 a	-4.94 \pm 0.15 a	-4.52 \pm 0.13 b
PE_36:3	LC1	-6.30 \pm 0.35 a	-6.22 \pm 0.26 a	-5.16 \pm 0.25 b	-5.41 \pm 0.52 b
PE_36:4	LC1	-1.89 \pm 0.14 a	-1.52 \pm 0.08 b	-1.32 \pm 0.16 c	-1.22 \pm 0.15 c
PE_36:5	LC1	-3.94 \pm 0.14 a	-3.20 \pm 0.20 b	-3.76 \pm 0.18 a	-3.29 \pm 0.19 b
PG_34:2	LC1	-6.26 \pm 0.23 a	-6.48 \pm 0.19 a	-6.30 \pm 0.20 a	-5.47 \pm 0.37 b
PG_34:3	LC1	-7.39 \pm 0.23 a	-6.65 \pm 0.34 b	-5.74 \pm 0.11 c	-5.46 \pm 0.30 c
PI_34:2	LC1	-3.46 \pm 0.15 a	-3.40 \pm 0.09 a	-3.23 \pm 0.12 b	-3.00 \pm 0.18 c
PI_34:3	LC1	-5.18 \pm 0.21 a	-4.76 \pm 0.24 b	-5.22 \pm 0.14 a	-4.23 \pm 0.15 c

全てのデータは \log_2 変換した。品種間異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

略語: DAG, diacylglycerol; TAG, triacylglycerol; MGDG, monogalactosyl diacyl glycerol; DGDG, digalactosyl diacyl glycerol; SQDG, sulfoquinovosyl diacylglycerol; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; PI, phosphatidylinositol.

Table 6 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉におけるフラボノイド・グリコアルカロイド組成

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) \pm SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
Flavonoids					
Kaempferol-3-O-rutinoside	LC2	-5.30 \pm 0.29 a	-4.05 \pm 0.80 b	-4.01 \pm 0.72 b	-1.36 \pm 0.31 c
Kaempferol-hexose-deoxyhexose-pentose	LC2	-4.46 \pm 0.82 a	-4.20 \pm 0.68 a	-3.89 \pm 0.57 a	-4.14 \pm 0.26 a
Naringenin or Naringenin chalcone	LC2	-1.45 \pm 1.03 b	-0.22 \pm 1.77 bc	-5.43 \pm 0.10 a	0.86 \pm 0.53 c
Naringenin dihexose	LC2	-4.96 \pm 0.67 a	-3.82 \pm 0.66 b	-5.44 \pm 0.10 a	-1.50 \pm 0.30 c
Quercetin-dihexose-deoxyhexose	LC2	-5.23 \pm 0.32 a	-4.30 \pm 0.95 b	-2.79 \pm 0.76 c	-0.76 \pm 0.42 d
Quercetin-hexose-deoxyhexose-pentose	LC2	-1.23 \pm 0.83 a	-0.93 \pm 0.81 a	-1.34 \pm 0.67 a	-1.22 \pm 0.22 a
Rutin	LC2	-1.24 \pm 1.01 a	0.59 \pm 0.77 b	-0.12 \pm 0.72 b	2.09 \pm 0.15 c
Alkaloids					
Acetoxysesquioside B	LC2	-5.58 \pm 0.58 a	-4.52 \pm 0.51 b	-5.29 \pm 0.40 a	-3.92 \pm 0.28 c
Acetoxy-hydroxytomatine isomer #1	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.22 \pm 0.14 a	-6.29 \pm 0.03 a	-4.61 \pm 0.36 b
Acetoxytomatine_1	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.15 \pm 0.19 a	-6.29 \pm 0.03 a	-5.51 \pm 0.33 b
Acetoxytomatine_2	LC2	-6.26 \pm 0.11 a	-5.30 \pm 0.65 b	-5.87 \pm 0.44 ab	-5.44 \pm 0.40 b
Alpha-tomatine	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-5.65 \pm 0.63 b	-6.29 \pm 0.03 a	-3.09 \pm 0.50 c
alpha-tomatine isomer					
Dehydrolycoperoside G/F or					
dehydroesculeoside A (isomer #1,#2,#3)	LC2	-5.87 \pm 0.43 a	-4.91 \pm 0.50 b	-5.00 \pm 0.35 b	-3.89 \pm 0.28 c
Dehydrotomatidine (Tomatidenol)_1	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.29 \pm 0.04 a	-6.29 \pm 0.03 a	-5.15 \pm 0.42 b
Dehydrotomatidine (Tomatidenol)_2	LC2	-6.30 \pm 0.03 a	-6.24 \pm 0.16 a	-6.29 \pm 0.03 a	-6.27 \pm 0.05 a
Dehydrotomatine isomer #1,#2,#3,#4,#5,#6	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.29 \pm 0.04 a	-6.29 \pm 0.03 a	-5.84 \pm 0.43 b
Esculeoside B isomer 1,2,3,4	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.29 \pm 0.04 a	-6.29 \pm 0.03 a	-5.37 \pm 0.94 b
Hydroxytomatine isomer #1,#2,#3,#4,#5,#6,#7	LC2	-5.53 \pm 0.51 a	-4.44 \pm 0.40 c	-4.94 \pm 0.25 b	-4.25 \pm 0.28 c
Lycoperoside G/F or					
esculeoside A + hexose - pentose	LC2	-6.23 \pm 0.18 a	-5.73 \pm 0.43 b	-6.06 \pm 0.31 ab	-5.08 \pm 0.32 c
Lycoperoside G/F or esculeoside A + hexose (isomer #1,#2,#3,#4,#5,#6)	LC2	-5.73 \pm 0.73 a	-4.73 \pm 0.59 b	-5.28 \pm 0.45 ab	-5.48 \pm 0.23 a
Tomatidine, Tomatidine isomer	LC2	-6.28 \pm 0.10 a	-4.50 \pm 0.82 b	-6.29 \pm 0.03 a	-2.20 \pm 0.42 c
UGA 8	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-5.93 \pm 0.56 b	-6.28 \pm 0.03 ab	-6.17 \pm 0.22 ab
UGA 10	LC2	-6.31 \pm 0.03 a	-6.26 \pm 0.08 a	-6.27 \pm 0.05 a	-5.19 \pm 0.71 b

全てのデータは \log_2 変換したものを示している。品種間で異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

UGA, unidentified glycoalkaloid.

Table 7 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉における糖および糖関連代謝産物組成

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) \pm SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
Sugars					
<i>N</i> -Acetyl-glucosamine	GC	26.41 \pm 0.27 a	26.61 \pm 0.43 a	26.76 \pm 0.40 a	27.69 \pm 0.73 b
1,6-Anhydro-beta-glucose	GC	7.97 \pm 3.04 a	8.65 \pm 2.94 a	10.34 \pm 1.85 a	8.01 \pm 2.32 a
Arabinose	GC	30.90 \pm 0.17 b	29.40 \pm 0.49 a	29.82 \pm 0.59 a	34.03 \pm 0.47 c
Fructose	GC	37.14 \pm 1.96 a	37.99 \pm 1.13 a	40.01 \pm 0.71 b	39.82 \pm 1.19 b
Fructose-6-phosphate	GC	22.91 \pm 0.22 b	22.45 \pm 0.22 a	22.19 \pm 0.25 a	22.41 \pm 0.18 a
Glucose	GC	37.22 \pm 0.06 a	37.33 \pm 0.07 b	37.43 \pm 0.06 c	37.31 \pm 0.06 b
Glucose-6-phosphate	GC	30.89 \pm 0.23 a	31.48 \pm 0.28 b	31.34 \pm 0.30 b	30.83 \pm 0.31 a
Galactose	GC	29.43 \pm 0.16 c	27.43 \pm 0.42 ab	27.22 \pm 0.40 a	27.82 \pm 0.39 b
Maltose	GC	21.21 \pm 0.24 a	22.12 \pm 0.17 b	22.64 \pm 0.28 c	22.37 \pm 0.28 bc
Raffinose	GC	18.69 \pm 1.20 a	17.72 \pm 1.20 a	18.04 \pm 1.76 a	18.87 \pm 1.09 a
Ribose	GC	35.55 \pm 0.64 c	34.48 \pm 0.50 b	32.71 \pm 0.53 a	34.36 \pm 0.66 b
Sucrose	GC	28.99 \pm 0.51 a	29.40 \pm 0.27 a	30.25 \pm 0.35 b	30.25 \pm 0.33 b
Trehalose	GC	28.81 \pm 0.61 a	30.47 \pm 0.42 bc	30.98 \pm 0.36 c	30.34 \pm 0.52 b
Xylose	GC	33.71 \pm 0.24 a	33.87 \pm 0.26 a	33.70 \pm 0.29 a	35.04 \pm 0.28 b
Sugar acids					
Galacturonic acid	GC	36.72 \pm 0.92 b	35.45 \pm 0.77 a	35.94 \pm 0.38 ab	38.19 \pm 0.32 c
Gluconic acid	GC	25.99 \pm 0.75 b	25.09 \pm 1.05 ab	22.15 \pm 5.04 a	23.89 \pm 2.81 ab
Glucuronic acid-ϵ-lactone	GC	30.46 \pm 0.51 b	29.75 \pm 0.44 a	30.11 \pm 0.28 ab	31.39 \pm 0.23 c
Glyceric acid	GC	29.53 \pm 0.29 c	26.67 \pm 0.76 b	27.45 \pm 0.67 b	25.10 \pm 0.77 a
Saccharic acid	GC	26.49 \pm 0.54 b	25.71 \pm 0.90 a	25.54 \pm 0.47 a	28.89 \pm 0.35 c
Sugar alcohols					
Galactinol	GC	26.79 \pm 0.53 a	28.21 \pm 0.43 b	27.29 \pm 0.41 ab	28.80 \pm 0.35 c
Glycerol	GC	27.93 \pm 0.24 b	27.10 \pm 0.19 a	26.87 \pm 0.37 a	27.99 \pm 0.23 b
myo-Inositol	GC	39.88 \pm 0.28 c	38.89 \pm 0.30 b	39.59 \pm 0.24 c	38.29 \pm 0.35 a
Sugar phosphate					
Inositol-1-phosphate	GC	23.05 \pm 0.18 b	22.33 \pm 0.30 a	22.57 \pm 0.36 a	23.36 \pm 0.24 b

全てのデータは \log_2 変換したものを示している。品種間で異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

Table 8 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉におけるカロテノイド組成

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) \pm SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
beta-Carotene	HPLC	0.16 \pm 0.02 b	0.18 \pm 0.04 b	0.13 \pm 0.02 a	0.11 \pm 0.01 a
Lycopene	HPLC	0.88 \pm 0.09 b	0.70 \pm 0.13 a	0.87 \pm 0.12 b	1.22 \pm 0.12 c

データは定量値 (mg/g dry weight) である。品種間で異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

Table 9 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉におけるアミノ酸・有機酸組成

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) ±SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
Amino acids					
Alanine	GC	34.367.5 c 0.24 a	35.31 ± 0.72 b	34.60 ± 0.58 ab	35.54 ± 1.16 b
beta-Alanine	GC	30.96 ± 0.49 b	29.58 ± 0.53 a	27.96 ± 0.69 a	30.54 ± 0.77 b
Arginine	GC	23.44 ± 0.31 b	23.08 ± 0.25 b	21.65 ± 0.38 a	22.81 ± 0.31 b
Asparagine	GC	31.09 ± 0.82 c	29.95 ± 0.61 b	26.03 ± 0.91 a	30.05 ± 0.83 c
Aspartic acid	GC	39.26 ± 0.33 c	37.45 ± 0.37 b	36.27 ± 0.29 a	39.01 ± 0.22 c
4-Aminobutyric acid	GC	39.69 ± 0.36 c	37.14 ± 0.68 b	35.69 ± 0.65 a	39.42 ± 0.52 c
Cysteine	GC	29.58 ± 0.34 c	28.53 ± 0.56 b	27.41 ± 0.71 a	29.75 ± 0.47 c
Cystine	GC	25.09 ± 0.49 b	24.30 ± 0.87 ab	24.02 ± 0.81 a	23.99 ± 0.44 a
Glutamine	GC	36.99 ± 0.80 c	34.84 ± 0.63 b	31.85 ± 0.81 a	34.96 ± 0.68 b
Glutamate	GC	35.10 ± 0.32 c	33.49 ± 0.50 b	32.47 ± 0.59 a	34.78 ± 0.27 c
Glycine	GC	33.44 ± 0.22 c	33.12 ± 0.46 bc	31.89 ± 0.45 a	32.78 ± 0.86 b
Histidine	GC	27.67 ± 0.30 c	26.79 ± 0.24 b	26.39 ± 0.26 a	26.81 ± 0.37 b
Homoserine	GC	23.20 ± 0.89 b	22.17 ± 0.84 b	20.04 ± 0.77 a	22.02 ± 0.97 b
Isoleucine	GC	34.06 ± 0.38 d	33.02 ± 0.52 c	30.84 ± 0.94 a	32.03 ± 0.93 b
Leucine	GC	31.21 ± 0.21 c	30.26 ± 0.54 b	28.99 ± 0.69 a	29.31 ± 0.86 a
Lysine	GC	34.76 ± 0.32 c	33.90 ± 0.34 bc	31.92 ± 1.39 a	33.24 ± 0.56 b
Methionine	GC	31.32 ± 0.21 b	30.74 ± 0.35 a	30.44 ± 0.36 a	31.45 ± 0.67 b
Ornithine	GC	28.98 ± 0.41 b	28.64 ± 0.62 ab	27.86 ± 1.95 ab	27.14 ± 1.44 a
Phenylalanine	GC	35.77 ± 0.31 b	34.66 ± 0.36 a	34.67 ± 0.44 a	34.30 ± 0.59 a
Proline	GC	32.83 ± 0.33 a	33.80 ± 0.67 b	33.56 ± 1.04 ab	34.32 ± 0.63 b
2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid	GC	32.97 ± 0.65 c	30.77 ± 1.39 b	27.36 ± 1.89 a	32.91 ± 0.45 c
Pyroglutamate	GC	38.74 ± 0.30 d	37.42 ± 0.32 b	35.83 ± 0.44 a	37.97 ± 0.26 c
Serine	GC	37.32 ± 0.46 d	36.42 ± 0.56 c	34.67 ± 0.53 a	35.62 ± 0.62 b
Threonine	GC	37.24 ± 0.41 d	35.07 ± 0.42 c	33.15 ± 0.52 a	33.94 ± 0.57 b
Tryptophan	GC	26.14 ± 0.28 b	25.34 ± 0.40 a	24.96 ± 0.63 a	25.32 ± 0.76 a
Valine	GC	32.70 ± 0.34 b	31.96 ± 0.69 b	30.63 ± 0.89 a	30.09 ± 1.11 a
Other organic acids					
cis-Aconitic acid	GC	34.57 ± 1.00 b	33.30 ± 0.69 ab	32.58 ± 1.41 a	33.55 ± 1.28 ab
trans-Caffeic acid	GC	29.91 ± 0.47 b	29.87 ± 0.63 ab	29.25 ± 0.69 ab	28.76 ± 1.55 a
Citric acid	GC	41.94 ± 0.19 a	41.97 ± 0.10 a	41.82 ± 0.37 a	41.83 ± 0.19 a
Fumaric acid	GC	21.69 ± 8.00 a	21.97 ± 6.37 a	18.61 ± 5.54 a	25.82 ± 4.01 a
Glutaric acid	GC	10.90 ± 2.55 a	11.66 ± 2.97 a	12.28 ± 0.78 a	11.58 ± 1.61 a
Glycolic acid	GC	27.04 ± 0.35 b	26.80 ± 0.62 ab	26.39 ± 0.50 a	26.97 ± 0.51 ab
Isocitric acid	GC	36.80 ± 0.07 a	36.89 ± 0.09 b	36.93 ± 0.05 b	36.95 ± 0.05 b
Itaconic acid	GC	33.22 ± 1.29 b	32.19 ± 1.18 ab	31.36 ± 1.65 a	32.47 ± 1.46 ab
Lactic acid	GC	29.93 ± 0.81 ab	28.18 ± 2.35 a	29.06 ± 1.08 ab	30.02 ± 1.13 b
Malic acid	GC	38.67 ± 0.35 a	38.06 ± 0.46 a	38.43 ± 0.56 a	38.57 ± 0.76 a
2-methyl-Maleic acid	GC	31.67 ± 1.57 a	30.25 ± 2.10 a	30.02 ± 1.79 a	30.58 ± 1.95 a
Nicotinic acid	GC	26.88 ± 0.18 b	26.10 ± 0.78 a	25.90 ± 0.68 a	25.82 ± 0.60 a
2-Oxoglutaric acid	GC	31.10 ± 0.69 c	29.04 ± 0.71 b	31.07 ± 0.53 c	26.83 ± 0.75 a
Oxalic acid	GC	27.39 ± 1.68 b	26.87 ± 0.90 b	25.27 ± 1.10 a	24.41 ± 0.68 a
Quinate	GC	30.36 ± 0.37 ab	30.47 ± 0.33 b	30.11 ± 0.14 a	30.57 ± 0.28 b
Shikimic acid	GC	20.04 ± 2.75 a	24.05 ± 1.88 b	26.17 ± 0.94 b	18.02 ± 4.27 a
trans-Sinapic acid	GC	30.16 ± 0.67 b	29.78 ± 0.85 ab	29.16 ± 0.68 a	31.54 ± 0.48 c
cis-Sinapic acid	GC	18.76 ± 2.86 a	18.11 ± 2.51 a	17.42 ± 1.50 a	17.11 ± 2.52 a
Suberic acid	GC	29.16 ± 0.34 a	29.53 ± 0.55 a	29.26 ± 2.75 a	30.19 ± 0.58 a
Succinate	GC	23.12 ± 0.36 c	22.13 ± 0.36 a	22.68 ± 0.31 b	23.51 ± 0.49 c
Threonic acid	GC	29.04 ± 0.37 a	28.48 ± 0.35 a	30.42 ± 0.66 b	28.57 ± 0.57 a
Threonic acid-1,4-lactone	GC	19.53 ± 2.13 a	18.08 ± 1.75 a	21.05 ± 2.76 a	17.86 ± 4.18 a

全てのデータは \log_2 変換したものを示している。品種間で異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

Table 10 *cd2* 変異体と野生型 3 系統の果肉における同定されたその他の代謝産物

Metabolite	Method	Arbitrary unit (AU) \pm SD			
		Ec-1	RC17	K091	KGM942
Amines		95.0 cM			
<i>n</i> -Butylamine	GC	24.71 \pm 0.29 a	24.41 \pm 0.53 a	24.88 \pm 0.30 a	24.75 \pm 0.31 a
1,3-Diamino-propane	GC	27.94 \pm 0.41 d	25.51 \pm 0.66 b	22.27 \pm 0.85 a	26.79 \pm 1.01 c
Hydroxylamine	GC	31.10 \pm 0.42 b	31.13 \pm 0.60 b	30.99 \pm 0.65 ab	30.26 \pm 0.71 a
5-Hydroxy-tryptamine	GC	29.82 \pm 0.40 c	29.28 \pm 0.34 b	29.09 \pm 0.34 b	28.20 \pm 0.14 a
Putrescine	GC	25.22 \pm 0.20 c	25.90 \pm 0.58 d	23.22 \pm 0.53 b	22.67 \pm 0.39 a
Spermidine	GC	24.39 \pm 0.89 b	23.78 \pm 1.15 b	22.16 \pm 1.19 a	23.91 \pm 0.55 b
Tryptamine	GC	27.02 \pm 0.57 c	26.02 \pm 0.85 b	23.73 \pm 1.05 a	29.63 \pm 0.36 d
Other annotated metabolites					
3-Amino-piperidin-2-one	GC	28.30 \pm 0.53 b	27.98 \pm 0.57 b	26.77 \pm 0.56 a	27.08 \pm 0.71 a
Chlorophyll_pheophytin a	LC1	-4.93 \pm 0.45 b	-5.36 \pm 0.48 b	-6.33 \pm 0.86 a	-4.72 \pm 0.63 b
3-Cyanoalanine	GC	23.59 \pm 0.59 c	22.69 \pm 0.73 b	19.66 \pm 0.78 a	22.68 \pm 0.70 b
Dihydrouracil	GC	32.84 \pm 0.78 a	34.08 \pm 0.36 c	33.53 \pm 0.26 bc	33.24 \pm 0.23 ab
2-Hydroxy-pyridine	GC	31.99 \pm 0.17 ab	31.85 \pm 0.20 a	31.99 \pm 0.23 ab	32.21 \pm 0.15 b
Lumichrome	GC	28.35 \pm 0.31 c	27.77 \pm 0.28 b	27.44 \pm 0.29 a	28.49 \pm 0.21 c
Plastochromanol-8	LC1	-2.10 \pm 0.14 b	-1.94 \pm 0.18 b	-2.55 \pm 0.26 a	-2.34 \pm 0.15 a
Plastoquinone-9	LC1	-2.46 \pm 0.21 a	-2.23 \pm 0.28 ab	-2.01 \pm 0.13 b	-0.96 \pm 0.26 c
Phosphate	GC	35.74 \pm 0.25 b	34.91 \pm 0.20 a	34.65 \pm 0.41 a	35.69 \pm 0.25 b
Phytol	GC	18.13 \pm 3.59 a	17.83 \pm 2.41 a	16.79 \pm 2.43 a	18.24 \pm 2.00 a

全てのデータは \log_2 変換したものを示している。品種間で異なるアルファベットは差が Tukey HSD 検定による有意水準 5% で有意であることを示している。太字で示した代謝産物は、*cd2* 変異体 KGM942 と野生型 3 系統の間で有意差のあるものを示している。

総合考察

本研究では、重要な園芸作物であるトマトにおいて、病害抵抗性、日持ち性といった多くの重要な形質に関与していると考えられているクチクラ層の特性の解明を目的として、表皮に関連する変異体として知られていた *sticky peel / light green (pe lg)* 変異体 (Butler, 1952; Kerr, 1982) の解析を行った。第 1 章において、クチクラ層の構造、水の透過性について解析を行ったところ、*pe lg* 変異体は果実および葉において、クチクラ層の構造に変異が生じていることが明らかになった。特に変異体の果実において、果皮に多く存在するフラボノイドが減少していること (Fig. 3)、クチンおよびワックスの量・組成が大きく変化することを明らかにした (Fig. 14)。フラボノイド含量が減少する変異体として *y* 変異体 (Adato et al, 2009; Ballester et al, 2010)、クチン、ワックスの量、組成が変化する変異体として *cd1*, *cd2*, *cd3* (Isaacson et al, 2009), *DFD* (Saladié et al, 2007) が既に知られていたが、フラボノイドおよびクチン・ワックスの含量が変化するという変異体はこれまで報告されていなかったため、*pe lg* 変異体は新規の変異体であると結論付けた。葉においては淡緑色となる *lg* 形質の原因について解析を行った。クロロフィル含量に差異はなく (Fig. 5)、クチクラ層の電子密度が薄くなっていることから (Fig. 6)、淡緑色はシロイヌナズナの *eceriferum* 変異体で報告されたように (Koornneef et al, 1989)、ワックスの量、組成による変化に起因する可能性がある。これらの結果を鑑みて、第 1 章では *pe lg* 変異体は、果実および葉のクチクラ層に異常が生じた変異体であると結論付けた。また、変異体の表現型解析によって、トマトにおいて果実および葉のクチクラ層は、シロイヌナズナと同様に、水の蒸散を防ぐ機能を有していることが確認できた。

更に、第 2 章において、*pe lg* 変異体の原因が *CD2* 遺伝子のフレームシフト変異であることを明らかにした。これは同じく *pe* 形質の原因が *CD2* 遺伝子の変異であると結論付けた Nadakuduti らの報告(2012)と一致する結果であった。アンチセンス法によって *CD2* 遺伝子発現抑制システムを作出し、表現型の解析を行った結果、第 1 章で明らかにした *pe lg* 形質が完全に再現された。葉が淡緑色となる *lg* 形質については、本研究では詳細な解析を行わなかったが、Nadakuduti らは葉におけるアントシアニンの欠失が原因であると推測している。実際、*CD2* 遺伝子は、シロイヌナズナのアントシアニンが欠失する変異体の原因遺伝子 *ANL2* とオーソログの関係にある(Kubo et al, 1999)ため、葉のアントシアニン蓄積に関して、シロイヌナズナ・トマト間で保存された機能を持っている可能性がある。果皮の水分透過性については、本研究で *pe lg* 変異体および *CD2* 遺伝子発現抑制システムにおいて、外部の水が容易に侵入する場合と内部の水が蒸散する場合で、特性が異なる、という結果が得られた。クチクラ層構成成分のうち、水の透過性に最も寄与しているとされるのは、ワックスのうち、アルカンである(Parsons et al, 2012)。オリジナルの *cd2* 変異体、*pe* 変異体の果実におけるアルカンの量は野生型よりも多い(Isaacson et al, 2009; Nadakuduti et al, 2012)ため、果実の水の蒸散が少ないという観察結果(Fig. 9, Fig. 25)と矛盾しない。しかし、一方で外部の水が容易に浸透するという表現型は、類似する知見が存在せず、現段階では原因が不明であり、引き続き検討が必要である。

CD2 遺伝子は、クラス IV のホメオドメインロイシンジッパー(HD-ZIP IV) 遺伝子(Nakamura et al, 2006)であり、ホメオドメインとともに、STeroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid Transfer (START)というドメインを有する(Schrack et al, 2004)。*pe lg* 変異体における *CD2* 遺伝子のフレームシフト変異は、C 末端側のアミノ酸が 160 残基無くなるものである。この変異は保存されたドメインが欠落するわけではないが、

pe lg 変異体の表現型は遺伝子を完全に抑制した際のものと同様であるため、欠落した領域は CD2 タンパク質が正常に機能するために必須の領域であると考えられる。Isaacson らによって報告された *cd2* 変異体もまた、C 末側の 1 個のアミノ酸残基の置換が原因であり(2009)、CD2 タンパク質の C 末端側の重要性を示唆している。HD-ZIP IV 遺伝子の中で、多くの研究がなされているものはシロイヌナズナの *GLABRA (GL) 2* 遺伝子である。この遺伝子は葉におけるトライコームの分化、根における根毛の発達、種皮の分化を制御している遺伝子であり、クチクラ層への関与は薄いものの、表皮の機能およびその分化に極めて重要な機能を有している(Lin and Aoyama, 2012)。それ以外に、機能解析がなされているこのクラスの遺伝子として *ARABIDOPSIS THALIANA MERISTEM LAYER (ATML) 1* (Lu et al, 1996) や *PROTODERMAL FACTOR (PDF) 2* (Abe et al, 2003) といった、茎頂における表皮分化に関与している遺伝子や、花成誘導に関与している *FWA* (Komeda, 2004) が知られている。また、前述したシロイヌナズナ *ANL2* 遺伝子の変異体は、当初葉のアントシアニン蓄積に関する変異体とされた(Kubo et al, 1999)が、近年クチンモノマーのうち、主要な構成要素であるジカルボン酸が減少していることが示され、クチクラ層にも変異が生じていることが明らかになった(Nadakuduti et al, 2012)。これらの知見から、HD-ZIP IV 遺伝子はクチクラ層の形成だけでなく、表皮の分化に幅広く寄与していることが示唆される。このため、*pe lg* 変異体においても、クチクラ層以外に表現型が出ている可能性が示唆された。このことを検証するため、第 3 章においてトマト果実を用いた代謝産物分析を行った。代謝産物の中で顕著であったのは、*pe lg* 変異体におけるガラクト脂質、一部のリン脂質の増加である(Table 5)。ガラクト脂質、リン脂質はプラスチド内で、ともに脂肪酸であるパルミチン酸、オレイン酸の前駆体(16:0 ACP, 18:1 ACP)から合成される。一方、*cd2* 変異体及び *pe lg* 変異体においては、

クチンモノマーの中でも特にパルミチン酸が減少していることが報告されているため (Isaacson et al, 2009; Nadakuduti et al, 2012)、余剰の脂肪酸前駆体がガラクト脂質、リン脂質の生合成経路へ流れた可能性が示唆される。ただし、本研究ではこれらの脂質成分を定量したわけではないため、この仮説を検証するためには、今後これらの脂質成分のターゲット分析が必要であると考えられる。

また、代謝産物分析の中で、次いで特徴的であったのは、*pe lg* 変異体におけるフラボノイド及びグリコアルカロイドの大幅な増加である。フラボノイドはシキミ酸経路 (Falcone Ferreyra et al, 2012)、グリコアルカロイドはステロールから合成されるため (Itkin et al, 2011)、脂肪酸の生合成とは独立している。このため、前述した脂肪酸代謝の変化では、この現象は説明できない。フラボノイド、グリコアルカロイドに共通して言えることは、双方ともに病虫害抵抗性に寄与する二次代謝産物であるということ (Schijlen et al, 2004; Sandrock and VanEtten, 1998)、主に表皮に蓄積される (Mintz-Oron et al, 2008)、という点である。*pe lg* 変異体において、フラボノイド、グリコアルカロイドが増加したことは、いくつかの理由が考えられる。一つ目の仮説は、クチクラ層の欠損が引き起こすストレスへの抵抗性反応である。一般的に、植物体がストレスを感知すると、フラボノイドの生合成が活性化されることが知られている (Treutter, 2006)。このため、クチクラ層の変異が植物体にとってストレスとなり、フラボノイド生合成が活性化されている可能性が考えられる。本研究では解析することができなかったが、*pe lg* 変異体を用いてストレス、病害抵抗性遺伝子の発現解析を行うことで、この仮説を検証できると考える。

もう一つの仮説は、表皮構造の変化に起因する、フラボノイド、グリコアルカロイドの局在変化である。前述したように、フラボノイド、グリコアルカロイドは果皮に多く存在する。一方で *pe lg* 変異体では、果皮が極めて薄いため、例えば果肉で合成されたナリンゲニンカルコンは野生型

ほど果皮に移行することができない (Fig. 3)。このため、余剰のフラボノイド、グリコアルカロイドが果肉中に残存する、と考えることができる。このことを支持するように、本研究の分析結果では、果実に含まれる主要なフラボノイドであるナリンゲニンおよびナリンゲニンカルコンの含量は、*pe lg* 変異体と野生型系統はほぼ同等 (*y* 変異を有する K091 のみが低含有) である一方で、ルチン、元々トマトには微量にしか含まれないナリンゲニン、ケンフェロール、ケルセチンといった下流の化合物は、*pe lg* 変異体で増加する傾向があった (Table 6)。グリコアルカロイドについても同様の現象が起こっている可能性がある。しかし、グリコアルカロイドは、本来トマトの赤熟果にはほとんど含まれていないため (Mintz-Oron et al, 2008)、*pe lg* 変異体では確かに含量が多い傾向があるが、代謝産物全体からみたインパクトはフラボノイドほど高くないと考える。*pe lg* 変異体におけるフラボノイドの局在変化を証明するためには、各組織におけるフラボノイド成分の定量分析を行い、各化合物の含有量を測定することが必要である。その際、果実の総フラボノイド含量が変化せず、*pe lg* 変異体あるいは *cd2* 遺伝子発現抑制系統において、下流のフラボノイド含量の割合が増加していれば、この仮説は確からしいといえる。その他の可能性として、*CD2* 遺伝子のオーソログ *ANL2* 遺伝子は、葉におけるアントシアニン蓄積に関与していることから、アントシアニン生合成、ひいてはフラボノイド生合成に何らかの影響を与えている可能性もある。このことを検証するためには、*CD2* 遺伝子発現抑制系統にて、一連のフラボノイド生合成遺伝子の発現解析を行う必要がある。第 3 章の結果より、*CD2* 遺伝子の変異により、機能性成分の量、組成が変化する可能性が示唆された。これらのメカニズムの解明については、本研究では検討することができなかったため、今後さらなる研究が必要である。

次に、ここでクチクラ層に着目したトマト品種開発の可能性について考察してみたい。*CD2* 遺伝子の変異はクチクラ層の水分透過性、物理特

性を変えてしまうため、トマトのクチクラ層形成に極めて重要な遺伝子であることを本研究で明らかにした。果実における水分の透過性、物理的強度は、日持ち性、輸送適性という観点から育種の重要なターゲットである(Bargel and Neinhuis, 2004; Saladié et al, 2007)。このため、果実のクチクラ層変異体の日持ち性の解析がなされている上、高日持ち性変異体のクチクラ層解析もまた行われている(Saladié et al, 2007; Isaacson et al, 2009; Kosma et al, 2010)。また、果皮の強度は、果実を食した際の食感にも影響する(Grierson and Kader, 1986)。食感については、果肉やゼリー一部の寄与も大きいものの、果皮の咀嚼のしやすさについても、研究がなされている(Causse et al, 2002)。このため、果皮の強度は日持ち性、輸送適性を高める点で高めていく必要がある一方で、食味向上という観点からは、薄い果皮のほうが消費者に好まれる傾向がある。このうち、日持ち性については、クチクラ層からの蒸散が関連していることから(Saladié et al, 2007)、クチクラ層の水分透過性を低減させることで実現可能である。本研究や他の研究事例から、クチクラ層の厚み、クチチンの量は、水分透過性と相関が無いことが明らかになっている(Isaacson et al, 2009; Nadakuduti et al, 2012)。このことから、果実の蒸散は、ワックス成分、特にアルカンがより重要であると考えられている(Parsons et al, 2012)。このため、クチチンの量を減らし、果皮を薄くしつつ、ワックスの組成を制御することで食味と日持ち性の向上を同時に実現することは可能であると考えられる。

一方、葉における水分透過性は、余分な水の蒸散を防ぐ、という観点から少ないほうが好ましい。*cd2* 変異体は、野生型系統よりも有意にクチクラ蒸散の量が多かった。このことは、植物体が光合成に利用できる水の量がより少なくなることを意味する。今回検討した Micro-Tom では、根の量が葉面積に対して十分量あるため、*cd2* 遺伝子発現抑制系統との間で光合成能力の差は見られなかったが、より大きな植物体では、

水利用効率の差に起因する光合成能力の差が出てくると考えられる。興味深いことに、*cd2* 変異体では、葉においてもクチンの量が減少するとともに、ワックス成分であるアルカンが減少することが明らかになっている(Nadakuduti et al, 2012)。*lecer6* 変異体を用いたの研究(Vogg et al, 2004)より、アルカンは果皮における水分透過性と関係があるため、葉においても水分透過性に関与している可能性がある。このため、葉のクチクラ蒸散を抑えるためには、アルカンをはじめとするワックス含量の制御が必要であると考えられる。

一方、クチクラ層の厚さは、病原菌への抵抗性にとって重要である。トマトの *cd1*, *cd2*, *cd3* 変異体では、クチン構成成分が野生型系統 M82 よりも著しく少ない上に、病原菌への抵抗性も低下している(Isaacson et al, 2009)。また、シロイヌナズナにおいて、クチンの生合成に関与している *CYP86A2* 遺伝子も、ノックアウトすると病原菌への感受性が高まることが報告されている(Xiao et al, 2004)。更に、トマト果実でクチンの含量が多い *DFD* 変異体は、野生型よりも病原菌に感染しにくいことも明らかになっている(Saladié et al, 2007)。これらのことから、病害抵抗性を高めるためには、クチンの含量を増大させることが有効であることが示唆される。これらのことから、クチン、ワックスの量、組成を制御することによって、トマトの日持ち性、ストレス耐性、あるいは病害抵抗性を高めることができると考えられる。

また、本研究によって、*cd2* 変異体の果実において、グリコアルカロイド、フラボノイド、リコピンの顕著な増加が認められた。グリコアルカロイドは、従来有毒成分とされてきたが、近年機能性に関する報告(Chao et al, 2012; Fujiwara et al, 2007)が出てきており、その利用可能性が注目を集めている。また、フラボノイド、リコピンもその機能性が古くから注目されている(Nijveldt et al, 2001; Rao et al, 2006)。トマトのフラボノイドは、通常ナリンゲニンカルコンが多く、次いで少量のルチンが含まれているが、

cd2 変異体では、ケルセチン、ケンフェロール、ルチンといった化合物が増えていた。クチクラ層の特性に着目することで、機能性成分の含有量を制御できる可能性を示したのは、本研究が初めてである。

本研究では、トマトの *pe lg* 変異体を用いて、原因遺伝子を同定し、その表現型について詳細な解析を行い、トマトのクチクラ層は、日持ち性、輸送適性、ストレス耐性、病害抵抗性に対して重要な機能を担っているだけでなく、機能性成分の量、組成にも大きな影響を与えていることを明らかにした。今日まで、クチクラ層の特性に着目した品種開発はあまり進んでいないが、近年クチクラ層に関する新たな知見、変異体が多く得られており、その利用可能性が明らかになりつつある。これらの知見、リソースが実際の育種に活用される日は遠くないと考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬご指導、ご鞭撻を賜りました研究指導教員の筑波大学教授 江面浩先生に深甚なる感謝を申し上げます。また、本研究の推進に際し常に貴重なご指導、ご助言を賜りました副指導教員の筑波大学教授 大澤良先生、高谷直樹先生、准教授 松倉千昭先生、助教 有泉亨先生に深く感謝を申し上げます。また、代謝産物分析について、ご協力、ご指導、ご助言頂きました理化学研究所上級研究員 草野都先生に心から感謝いたします。また、研究期間中、絶えず激励、アドバイスを頂いた食品総合研究所の伊藤康博博士に感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださいましたカゴメ株式会社 代表取締役 西秀訓氏、取締役常務執行役員 児玉弘仁氏、取締役常務執行役員 佐藤邦彦氏並びに役員の方々、元農業研究部長 細井克敏氏、農業研究部長 尾崎泰弘氏に深く感謝いたします。

また、本研究の推進にあたり、ご支援を賜りましたカゴメ株式会社研究開発本部農業研究部をはじめとするカゴメ株式会社の皆様に心から感謝いたします。

引用文献

Abe M, Katsumata H, Komeda Y, Takahashi T (2003) Regulation of shoot epidermal cell differentiation by a pair of homeodomain proteins in *Arabidopsis*. *Development* **130**: 635-643.

Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M et al (2009) Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a *SIMYB12*-regulated transcriptional network. *PLoS Genet* **5**: e1000777

An G, Ebert R, Mitra A, Ha S (1988) Binary vectors. In *Plant molecular biology manual*. Edited by Gelvin, S.B. and Schilpeoort, R.A. pp. 1-19. Kluwer, The Netherlands

Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F et al (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol* **144**: 1863-1877

Bai Y, Lindhout P (2007) Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Ann Bot* **100**: 1085-1094

Ballester AR, Molthoff J, de Vos R, Hekkert BL, Orzaez D, Fernández-Moreno JP et al (2010) Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor *SIMYB12* leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiol* **152**: 71-84

Bargel H, Neinhuis C (2004) Altered tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit cuticle biomechanics of a pleiotropic non ripening mutant. *J Plant Growth Regul* **23**: 61-75

Bargel H, Neinhuis C (2005) Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit growth and ripening as related to the biomechanical properties of fruit skin and isolated cuticle. *J Exp Bot* **56**: 1049-1060

Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraca L, Efremova N, Yephremov A et al (2011) A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 1958–1970

Bessire M, Chassot C, Jacquat AC, Humphry M, Borel S, Petétot JM et al (2007) A permeable cuticle in *Arabidopsis* leads to a strong resistance to *Botrytis cinerea*. *EMBO J* **26**: 2158-2168

Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir S et al (2002) High-flavonol tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes *LC* and *Cl*. *Plant Cell* **14**: 2509–2526

Buda GJ, Isaacson T, Matas AJ, Paolillo DJ, Rose JK (2009) Three-dimensional imaging of plant cuticle architecture using confocal scanning laser microscopy. *Plant J* **60**: 378-385

Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S et al (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat Biotechnol* **26**: 1301-1308

Butler L (1952) *Sticky peel (pe)*, a new character in the seventh linkage group. *TGC report* **2**: 2-3

Causse M, Saliba-Colombani V, Lecomte L, Duffé P, Rousselle P, Buret M (2002) QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *J Exp Bot* **53**: 2089-2098

Chaïb J, Devaux MF, Grotte MG, Robini K, Causse M, Lahaye M, et al (2007) Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *J Exp Bot* **58**:1915-1925

Chao MW, Chen CH, Chang YL, Teng CM, Pan SL (2012) α -Tomatine-mediated anti-cancer activity in vitro and in vivo through cell cycle- and caspase-independent pathways. *PLoS One* **7**: e44093

Chassot C, Nawrath C, Métraux JP (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J* **49**: 972-980

Chen X, Goodwin SM, Boroff VL, Liu X, Jenks MA (2003) Cloning and characterization of the *WAX2* gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *Plant Cell* **15**: 1170-1185

Curvers K, Seifi H, Mouille G, De Rycke R, Asselbergh B, Van Hecke A et al (2010) ABA-deficiency causes changes in cuticle permeability and pectin composition that influence tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **154**: 847-860

Davies JN, Hobson GE (1981) The constituents of tomato fruit - the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crit Rev Food Sci Nutr* **15**: 205-280

Eshed Y, Zamir D (1994) A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica* **79**:175-179

Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* **3**:222

Freitas ST, Shackel KA, Mitcham EJ (2011) Abscisic acid triggers whole-plant and fruit-specific mechanisms to increase fruit calcium uptake and prevent blossom end rot development in tomato fruit. *J Exp Bot* **62**: 2645-2656

Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M, Matsushita S, Iijima Y, Aoki K et al (2007) Esculeogenin A, a new tomato saponin, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**: 2400-2406

Foolad MR (2007) Genome mapping and molecular breeding of tomato. *Int J Plant Genomics* **2007**: 64358

Gaff DF, Oliver M (2013) The evolution of desiccation tolerance in angiosperm plants: a rare yet common phenomenon. *Funct Plant Biol* **40**: 315–328

Girard AL, Mounet F, Lemaire-Chamley M, Gaillard C, Elmorjani K, Vivancos J et al (2012) Tomato *GDSL1* is required for cutin deposition in the fruit cuticle. *Plant Cell* **24**: 3119-3134

Grierson D, Kader AA (1986) "Fruit ripening and quality," in *The Tomato Crop*, Atherton JG, Rudich J, Eds., pp. 241–280, Chapman and Hall, New York, NY, USA

Harborne JB (1994) *The flavonoids. advances in research since 1986*. Chapman & Hall, London

Harrison E, Burbidge A, Okyere JP, Thompson AJ, Taylor IB (2011) Identification of the tomato ABA-deficient mutant *sitiens* as a member of the ABA-aldehyde oxidase gene family using genetic and genomic analysis. *Plant Growth Regulation* **64**: 301-309

Heuvelink E (2005) *Tomatoes*. CABI

Hiscox JD, Israelstam GF (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can J Bot* **57**: 1332-1334

Ho LC, Hewitt JD (1986) Fruit development. In: Atherton JG, Rudich J (ed) *Tomato Crop*. Chapman and Hall, New York, pp 201–239

Hovav R, Chehanovsky N, Moy M, Jetter R, Schaffer AA (2007) The identification of a gene (*Cwp1*), silenced during *Solanum* evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. *Plant J* **52**: 627-639

Hrazdina G, Marx GA, Hoch HC (1982) Distribution of secondary plant metabolites and their biosynthetic enzymes in pea (*Pisum sativum* L.) leaves : anthocyanins and flavonol glycosides. *Plant Physiol* **70**:745-748

Hunt GM, Baker EA (1980) Phenolic constituents of tomato fruit cuticles. *Phytochemistry* **19**: 1415–1419

Isaacson T, Kosma DK, Matas AJ, Buda GJ, He Y, Yu B et al (2009) Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant J* **60**:

363-377

Itkin M, Rogachev I, Alkan N, Rosenberg T, Malitsky S, Masini L, et al (2011) GLYCOALKALOID METABOLISM1 is required for steroidal alkaloid glycosylation and prevention of phytotoxicity in tomato. *Plant Cell* **23**: 4507-4525

Jonsson P, Johansson ES, Wuolikainen A, Lindberg J, Schuppe-Koistinen I, Kusano M et al (2006) Predictive metabolite profiling applying hierarchical multivariate curve resolution to GC-MS data--a potential tool for multi-parametric diagnosis. *J Proteome Res* **5**: 1407-1414

Kauss H, Fauth M, Merten A, Jeblick W (1999) Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers via both an inducible and a constitutive H₂O₂-generating system. *Plant Physiol* **120**:1175-1182

Kerr EA (1982) New Residents on Chromosome 1: *rvt, vi, lg, pe, dp, Nr-2, tmf, cff*. TGC report **32**: 16-17

Kim YI, Hirai S, Goto T, Ohyan C, Takahashi H, Tsugane T et al (2012) Potent PPAR α activator derived from tomato juice, 13-*oxo*-9,11-octadecadienoic acid, decreases plasma and hepatic triglyceride in obese diabetic mice. *PLoS One* **7**: e31317

Kimbara J, Yoshida M, Ito H, Hosoi K, Kusano M, Kobayashi M et al (2012) A novel class of *sticky peel* and *light green* mutations causes cuticle deficiency in leaves and fruits of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Planta* **236**: 1559–1570

Komeda Y (2004) Genetic regulation of time to flower in *Arabidopsis thaliana*. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 521-35

Koornneef M, Hanhart CJ, Thiel F (1989) A genetic and phenotypic description of *eceriferum (cer)* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J Hered* **80**: 118-122

Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmuller E et al (2005) GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. *Bioinformatics* **21**: 1635-1638.

Kosma DK, Bourdenx B, Bernard A, Parsons EP, Lü S, Joubès J et al (2009) The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**: 1918–1929

Kosma DK, Parsons EP, Isaacson T, Lü S, Rose JK, Jenks MA (2010) Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiol Plant* **139**: 107-117

Kubo H, Peeters AJM, Aarts MGM, Pereira A, Koornneef M (1999) *ANTHOCYANINLESS2*, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 1217–1226

Kraus M, Galensa R (1992) Bestimmung von naringenin und naringenin-chalkon in tomatenschalen mit RP-HPLC nach festphasenextraktion. *Z Lebensm Unters Forsch* **194**: 29-32

Kurdyukov S, Faust A, Nawrath C, Bär S, Voisin D, Efremova N et al (2006) The epidermis-specific extracellular BODYGUARD controls cuticle development and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 321-339

Kusano M, Fukushima A, Arita M, Jonsson P, Moritz T, Kobayashi M et al (2007a) Unbiased characterization of genotype-dependent metabolic regulations by metabolomic approach in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Syst Biol* **1**: 53

Kusano M, Fukushima A, Kobayashi M, Hayashi N, Jonsson P, Moritz T et al (2007b) Application of a metabolomic method combining one-dimensional and two-dimensional gas chromatography-time-of-flight/mass spectrometry to metabolic phenotyping of natural variants in rice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **855**: 71-79

Leide J, Hildebrandt U, Reussing K, Riederer M, Vogg G (2007) The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a beta-ketoacyl-coenzyme A synthase (*LeCER6*). *Plant Physiol* **144**: 1667-1679

Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD et al (2010) Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book*.**11**: e0161.

Li Y, Beisson F (2009) The biosynthesis of cutin and suberin as an alternative source of enzymes for the production of bio-based chemicals and materials. *Biochimie* **91**: 685-691

Li Y, Beisson F, Koo AJ, Molina I, Pollard M, Ohlrogge J (2007) Identification of acyltransferases required for cutin biosynthesis and production of cutin with suberin-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18339-18344

Lin Q, Aoyama T (2012) Pathways for epidermal cell differentiation via the homeobox gene *GLABRA2*: update on the roles of the classic regulator. *J Integr Plant Biol* **54**: 729-737

Lolle SJ, Berlyn GP, Engstrom EM, Krolkowski KA, Reiter WD, Pruitt RE (1997) Developmental regulation of cell interactions in the *Arabidopsis fiddlehead-1* mutant: a role for the epidermal cell wall and cuticle. *Dev Biol* **189**: 311-321

Lolle SJ, Hsu W, Pruitt RE (1998) Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 607-619

Lu P, Porat R, Nadeau JA, O'Neill SD (1996) Identification of a meristem L1 layer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class of homeobox genes. *Plant Cell* **8**: 2155-2168

Lu SY, Song T, Kosma DK, Parsons EP, Rowland O, Jenks, MA (2009). *Arabidopsis CER8* encodes *LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1)* that has overlapping functions with *LACS2* in plant wax and cutin synthesis. *Plant J* **59**: 553–564

Matas AJ, Cobb ED, Paolillo DJ, Niklas KJ (2004) Crack resistance in cherry tomato fruit correlates with cuticular membrane thickness. *HortScience* **39**: 1354-1358

McFarlane HE, Shin JJ, Bird DA, Samuels AL (2010) *Arabidopsis* ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* **22**: 3066–3075

Mintz-Oron S, Mandel T, Rogachev I, Feldberg L, Lotan O, Yativ M et al (2008) Gene expression and metabolism in tomato fruit surface tissues. *Plant Physiol* **147**: 823–851

Muir SR, Collins GJ, Robinson S, Hughes S, Bovy A, Ric De Vos, CH et al (2001) Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. *Nature Biotechnol* **19**: 470–474

Muñoz, P., Antón, A., Nuñez, M., Paranjpe, A., Ariño, J., Castells, X et al (2008) Comparing the environmental impacts of greenhouse versus open-field tomato production in the mediterranean region. *Acta Hort* **801**: 1591-1596

Nadakuduti SS, Pollard M, Kosma DK, Allen C, Ohlrogge JB, Barry CS (2012) Pleiotropic phenotypes of the sticky peel mutant provide new insight into the role of *CUTIN DEFICIENT2* in epidermal cell function in tomato. *Plant Physiol* **159**: 945–960

Nakamura M, Katsumata H, Abe M, Yabe N, Komeda Y, Yamamoto KT et al (2006) Characterization of the class IV homeodomain-Leucine Zipper gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**: 1363-1375

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**: 418-425

Ohta H, Shimojima M, Awai K, Masuda T, Takamiya K (1997) Glycolipids in chloroplast thylakoid membrane : The mechanism for the biosynthesis and evolutionary origin. *Tanpakushitsu-Kakusan-Koso* **42**: 2601-2612

Panikashvili D, Shi JX, Schreiber L, Aharoni A (2011) The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis. *New Phytol* **190**: 113–124

Parsons EP, Popopvsky S, Lohrey GT, Lü S, Alkalai-Tuvia S, Perzelan Y, et al (2012) Fruit cuticle lipid composition and fruit post-harvest water loss in an advanced backcross generation of pepper (*Capsicum* sp.). *Physiol Plant* **146**: 15-25

Pollard M, Beisson F, Li Y, Ohlrogge JB (2008) Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends Plant Sci* **13**: 236-246

Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **975**: 384-394

Rao AV, Ray MR, Rao LG (2006) Lycopene. *Adv Food Nutr Res* **51**: 99-164

Redestig H, Fukushima A, Stenlund H, Moritz T, Arita M, Saito K, Kusano M (2009) Compensation for systematic cross-contribution improves normalization of mass spectrometry based metabolomics data. *Anal Chem* **81**: 7974-7980

Reina-Pinto JJ, Yephremov A (2009) Surface lipids and plant defenses. *Plant Physiol Biochem* **47**: 540-549

Saladié M, Matas AJ, Isaacson T, Jenks MA, Goodwin SM, Niklas KJ et al (2007) A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol* **144**: 1012-1028

Saladié M, Rose JKC, Watkins CB (2005) Characterization of *DFD (DELAYED FRUIT DETERIORATION)*: a new tomato mutant. *Acta Hort* **682**: 79-84

Samuels L, Kunst L, Jetter R (2008) Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 683-707

Sandroek RW, Vanetten HD (1998) Fungal sensitivity to and enzymatic degradation of the phytoanticipin alpha-tomatine. *Phytopathology* **88**:137-143

Schijlen EG, Ric de Vos CH, van Tunen AJ, Bovy AG (2004) Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry* **65**:2631-2648

Schnurr J, Shockey J, Browse J (2004) The acyl-CoA synthetase encoded by *LACS2* is essential for normal cuticle development in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 629-642

Schrack K, Nguyen D, Karlowski WM, Mayer KF (2004) START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors. *Genome Biol* **5**: R41

Slimestad R, Verheul M (2009) Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *J Sci Food Agric* **89**: 1255–1270

Sieber P, Schorderet M, Ryser U, Buchala A, Kolattukudy P, Métraux JP et al (2000) Transgenic *Arabidopsis* plants expressing a fungal cutinase show alterations in the structure and properties of the cuticle and postgenital organ fusions. *Plant Cell* **12**:721-738

Stein SE, Ausloos P, Clifton CL, Klassen JK, Lias SG Mikaya AI et al (1999) Evaluation of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. *Abst Pap Am Chem Soc* **218**: U368

Stevens MA and Rick CM (1986) “Genetics and Breeding,” in *The Tomato Crop*, Atherton JG, Rudich J, Eds., pp. 35–110, Chapman and Hall, New York, NY, USA

Stewart AJ, Bozonnet S, Mullen W, Jenkins GI, Lean ME, Crozier A (2000) Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agric Food Chem* **48**: 2663-2669

Sun, HJ, Uchii S, Watanabe S, Ezura H (2006) A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant Cell Physiol* **47**: 426–431

Tanaka T, Tanaka H, Machida C, Watanabe M, Machida Y (2004) A new method for rapid visualization of defects in leaf cuticle reveals five intrinsic patterns of surface defects in *Arabidopsis*. *Plant J* **37**: 139-146

Tang D, Simonich MT, Innes RW (2007) Mutations in *LACS2*, a long-chain acyl-coenzyme A synthetase, enhance susceptibility to avirulent *Pseudomonas syringae* but confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**: 1093-1103

Treutter D (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters* **4**: 147-157

Thakur BR, Singh RK, Nelson PE (1996) Quality attributes of processed tomato products: A review. *Food Rev Int* **12**: 375-401

Verhoeven ME, Bovy A, Collins G, Muir S, Robinson S, de Vos CHR et al (2002) Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *J Exp Bot* **53**: 2099–2106.

Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA et al (2004) Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid beta-ketoacyl-CoA synthase. *J Exp Bot* **55**: 1401-1410

Welleken K, Durst F, Pinot F, Benveniste I, Nettesheim K, Wisman E et al (2001) Functional analysis of the *LACERATA* gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid omega-hydroxylation in development. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 9694-9699

Wilkinson S, Corlett JE, Oger L, Davies WJ (1998) Effects of xylem pH on transpiration from wild-type and *flacca* tomato leaves. A vital role for abscisic acid in preventing excessive water loss even from well-watered plants. *Plant Physiol* **117**: 703-709

Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol* **5**:218-223

Xiao F, Goodwin SM, Xiao Y, Sun Z, Baker D, Tang X et al (2004) *Arabidopsis* *CYP86A2* represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *EMBO J* **23**: 2903-2913

Yano K, Watanabe M, Yamamoto N, Tsugane T, Aoki K, Sakurai N, Shibata D (2006) MiBASE: A database of a miniature tomato cultivar Micro-Tom. *Plant Biotechnol* **23**: 195-198

Yeats TH, Martin LBB, Viart HMF, Isaacson T, He Y, Zhao L et al (2012) The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chem Biol* **8**: 609–611

Yeats TH, Rose JK (2013) The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiol* **16**: 5-20

Young PA (1941) New genetic characters of the tomato. *Am Nat* **75**: 280

Zhang Y, Butelli E, De Stefano R, Schoonbeek HJ, Magusin A, Pagliarani C et al (2013) Anthocyanins double the shelf life of tomatoes by delaying overripening and reducing susceptibility to gray mold. *Curr Biol* **23**: 1094-1100

APPENDIX

メタボロームプロファイリングにおけるサンプル調製、分析条件、データ処理方法については、以下の通りである。

CHEMICAL ANALYSIS METADATA

Sample preparation

Sample processing and extraction

Samples were lyophilized in 2-ml tubes, frozen at -20°C and then homogenized with 5 mm Zirconia beads in a Mixer Mill MM301 (Retsch, Haan, Germany) at 20 Hz for 1 min. Two milligrams dry weight (DW) of the lyophilized samples were used in GC-MS and LC-q-TOF-MS analyses, while 7.5 mg DW of the samples were used for lipid and carotenoid analyses.

Extraction and derivatization for GC-MS analysis

Each sample was extracted at a concentration of 2.5 mg DW of tissues per ml extraction medium (methanol/chloroform/water [3:1:1, v/v/v]) containing 10 stable isotope reference compounds ($[^2\text{H}_4]$ -succinic acid, $[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}]$ -glutamic acid, $[^2\text{H}_7]$ -cholesterol, $[^{13}\text{C}_3]$ -myristic acid, $[^{13}\text{C}_5]$ -proline, $[^{13}\text{C}_{12}]$ -sucrose, $[^{13}\text{C}_4]$ -hexadecanoic acid, $[^2\text{H}_4]$ -1,4-butanediamine, $[^2\text{H}_6]$ -2-hydroxybenzoic acid and $[^{13}\text{C}_6]$ -glucose) using a Retsch Mixer Mill MM301 at a frequency of 15 Hz for 10 min at 4°C. Each isotope compound was adjusted to a final concentration of 15 ng/ μl for each 1- μl injection. After centrifugation for 5 min at $15,100 \times g$, a 200- μl aliquot of the supernatant was drawn and transferred to a glass insert vial. The extracts were evaporated to dryness in an SPD2010 SpeedVac® concentrator from ThermoSavant (Thermo Fisher Scientific, MA, US). For methoximation, 30 μl of methoxyamine hydrochloride (20 mg/ml in pyridine) was added to the sample. After 45 h of derivatization at room temperature, the sample was trimethylsilylated for 1 h using 30 μl of N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (MSTFA, Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) at 37°C with shaking. Thirty microliters of *n*-heptane was added following silylation. All the derivatization steps were performed in the vacuum glove box VSC-100 (Sanplatec, Japan) filled with 99.9995% (G3 grade) of dry nitrogen.

Extraction for LC-MS analysis

Two milligrams dry weight of each sample was extracted in 30 volumes of extraction medium (methanol/water [2:5, v/v]) containing two reference compounds (0.5 mg/l flavonol-2'-sulfonic acid and 1.0 mg/l ampicillin) using a Mixer Mill MM301 (Retsch) at a frequency of 20 Hz for 5 min at 4°C. After centrifugation for 10 min at 15,000 × g, the supernatant was transferred into a 2-ml tube. Thirty volumes of methanol was added to the tube and then extracted again using the mixer mill at a frequency of 20 Hz for 5 min at 4°C. After centrifugation for 10 min at 15,000 × g, the resulting supernatant was transferred to the tube. A 120-μl aliquot of extract was filtered using an Oasis® HLB μElution plate (30 μm, Waters Co., Massachusetts, US). The extracts (100 μl) were transferred into 2-ml tubes and evaporated to dryness in an SPD2010 SpeedVac® concentrator from ThermoSavant (Thermo Fisher Scientific). The extracts were dissolved in 100 μl of 20% aqueous methanol containing 0.5 mg l⁻¹ lidocaine and 10-camphorsulfonic acid.

Extraction for lipid and carotenoid analyses

Each sample (7.5 mg DW) was extracted with 1238 μl of chloroform/methanol (1:2, v/v) containing 0.1% dibutylhydroxytoluene (BHT) (SIGMA), 1.25 μM 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SIGMA), and 12.5 μM β-apo-8'-carotenal (SIGMA). Samples were vigorously mixed using a vortex mixer. After a 5-min incubation at room temperature, 330 μl of water was added to each sample and the samples were centrifuged at 10,000 × g at room temperature for 5 min. The supernatant was transferred to a 2-ml tube containing 526 μl of chloroform/water (1:1, v/v) and incubated on ice for 10 min. The separated layer was formed by centrifugation at 1,000 × g at 4°C for 10 min. For lipid analysis and HPLC analysis, 85 μl and 340 μl of the lower organic phase were transferred to 1.5-ml tubes, respectively. Each extract was evaporated to dryness using an SPD2010 SpeedVac® concentrator (Thermo Fisher Scientific). The residues were dissolved in 162 μl of ethanol and 81 μl of chloroform/ethanol (1:1, v/v) containing 0.1% BHT, for lipid analysis and HPLC analysis, respectively, and centrifuged at 12,000 × g at 4°C for 5 min. Then, 140 μl and 60 μl of supernatant were transferred to glass tubes for polar lipid analysis and HPLC analysis, respectively.

Analytical conditions

Chemicals:

All chemicals and reagents used in this study were of spectrometric grade. Most of the chemicals were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) or Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Sample amount:

For GC-MS analysis: an equivalence of 2.8 µg DW of the derivatized samples was injected.

For LC-MS analysis: an equivalence of 16.7 µg DW was injected.

For lipid analysis: an equivalence of 5 µg DW was injected.

For HPLC analysis: an equivalence of 80 µg DW was injected.

GC-TOF-MS conditions

One microliter of each sample was injected in the splitless mode by an CTC CombiPAL Autosampler (CTC analytics, Zwingen, Switzerland) into an Agilent 6890N Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, US) equipped with a 30 m × 0.25 mm inner diameter fused-silica capillary column with a chemically bound 0.25-µl film Rtx-5 Sil MS stationary phase (RESTEK, Bellefonte, US) for metabolome analysis. Helium (G1 grade, 99.99995%) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 ml/min. The temperature program for metabolome analysis started with a 2-min isothermal step at 80°C and this was followed by temperature ramping at 30°C to a final temperature of 320°C, which was maintained for 3.5 min. The transfer line and the ion source temperatures were 250 and 200°C, respectively. Ions were generated by a 70-eV electron beam at an ionization current of 2.0 mA. The acceleration voltage was turned on after a solvent delay of 273 s. Data acquisition was performed on a Pegasus IV TOF mass spectrometer (LECO, MI, US) with an acquisition rate of 30 spectra/s in the mass range of a mass-to-charge ratio of $m/z = 60\text{--}800$. Alkane standard mixtures (C8–C20 and C21–C40) were purchased from Sigma–Aldrich (Tokyo, Japan) and were used to calculate the retention index (RI) [2, 3]. The normalized response used to calculate the signal intensity of each metabolite from the mass-detector response was obtained by each selected ion current that was unique in each metabolite MS spectrum to normalize the peak response. For quality control, methylstearate (SIGMA–Aldrich) was injected into every six samples. Data was normalized using the CCMN algorithm [4].

LC-q-TOF-MS conditions

After preparation, the extracts (1 µl) were analyzed using an LC-MS system equipped with an electrospray ionization (ESI) interface (LC, Waters Acquity UPLC system; MS, Waters Xevo G2 Q-ToF). The analytical conditions were as follows: LC, column, Acquity bridged ethyl hybrid (BEH) C18 (pore size, 1.7 µm; length, 2.0 × 100 mm; Waters); solvent system, acetonitrile (0.1% formic acid):water (0.1% formic acid); gradient program, 99.5% A/0.5% B at 0 min, 99.5% A/0.5% B at 0.1 min, 20% A/80% B at 10 min, 0.5% A/99.5% B at 10.1 min, 0.5% A/99.5% B at 12.0 min, 99.5% A/0.5% B at 12.1 min and 99.5% A/0.5% B at 15.0 min; flow rate, 0.3 ml min⁻¹; temperature, 40°C; MS detection; capillary voltage, +3.0 keV; cone voltage, 25.0 V; source temperature, 120 °C; desolvation temperature, 450°C; cone gas flow, 50 l/h; desolvation gas

flow, 800 l/h; collision energy, 6 V; mass range, m/z 100–1500; scan duration, 0.1 s; interscan delay, 0.014 s; mode, centroid; polarity, positive; Lockspray (Leucine enkephalin): scan duration, 1.0 s; and interscan delay, 0.1 s. The data were recorded using MassLynx version 4.1 software (Waters).

LC-q-TOF-MS conditions for lipid analysis

Sample extracts (1 μ l) were analyzed using an LC-MS system equipped with an electrospray ionization (ESI) interface (HPLC, Waters Acquity UPLC system; MS, Waters Xevo G2 Qtof). A two-solvent (A and B) system was used to separate each metabolite. The composition of these solvents was as follows: solvent A, acetonitrile : water : 1 M ammonium acetate : formic acid = (158 g : 800g : 10 ml : 1 ml); solvent B, acetonitrile : 2-propanol : 1 M ammonium acetate : formic acid = (79 g : 711 g : 10 ml : 1 ml). The analytical conditions were as follows: HPLC, column, Acquity UPLC HSS T3 (pore size, 1.8 μ m; 1.0 i.d \times 50 mm long; Waters); gradient program, 35% B at 0 min, 70% B at 3 min, 85% B at 7 min, 90% B at 10 min, 90% B at 12 min and 35% B at 12.5 min; flow rate, 0.15 ml min⁻¹; temperature, 55°C; MS detection; capillary voltage, +3.0 kV; cone voltage, 20 V for positive mode and 40 V for negative mode; source temperature, 120°C; desolvation temperature, 450°C; cone gas flow, 50 l h⁻¹; desolvation gas flow, 450 l/h; collision energy, 6 V; detection mode, scan (m/z 100–2000; scan time, 0.5 s; centroid). The scans were repeated for 15 min in a single run. The data were recorded using MassLynx version 4.1 software (Waters).

HPLC conditions for carotenoid and chlorophyll quantification

Extracts (2 μ l, ca. 80 μ g of each sample) were analyzed using an LC-photodiode array (PDA) (LC, Shimadzu LC-20AD system; PDA, Shimadzu SPD-M20A) operated by Shimadzu LCMS solution software (version 5.41). A two-solvent system was used to separate each carotenoid and chlorophyll. The analytical conditions were as follows: Column, Develosil C30-UG (2.0 mm I.D., 250 mm long; Nomura chemical); solvent A, methanol (4.5% water and 0.1% triethylamine); solvent B, hexane/isopropyl alcohol (60:40, v/v. 0.1% triethylamine); gradient program, 1% B at 0 min, 1% B at 9 min, 6% B at 9.5 min, 7% B at 19 min, 18% B at 20 min, 20% B at 18 min, 34% B at 28 min, 48% B at 36 min, 100% B at 48.5 min, 100% B at 53.5 min, 1% B at 54 min (total run time, 60 min); flow rate, 0.37 ml/min; column temperature, 30°C.

Data processing

Data processing for GC-MS data

Non-processed MS data from GC-TOF/MS analysis generated by chromatography processing and mass spectral deconvolution software, Leco ChromaTOF version 3.22 (LECO, St. Joseph, MI, USA) were exported in NetCDF format to MATLAB 6.5 (Mathworks, Natick, MA,

USA), where all data-pretreatment procedures, such as smoothing, alignment, time-window setting and H-MCR, were carried out [5]. The resolved MS spectra were matched against reference mass spectra using the NIST mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH mass spectral library (version 2.0) and our custom software for peak annotation written in JAVA. Peaks were identified or annotated based on retention indexes (RIs) and the reference mass spectra comparison to the Golm Metabolome Database (GMD; http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/msri/gmd_msri.html) released from CSB.DB [6] and our in-house spectral library. The metabolites were identified by comparison with RIs from the library databases (GMD and our own library) and with those of authentic standards, and the metabolites were defined as annotated metabolites on comparison with mass spectra and RIs from these two libraries.

Data processing for LC-MS data

The data matrix was aligned using MassLynx version 4.1 (Waters). The profiling data files were converted to the NetCDF format using the DataBridge function of the MassLynx software. After the processes of alignment and deisotoping with the set of NetCDF data files, the data matrix was obtained.

For normalization, the intensity values of the remaining peaks were divided by those of lidocaine ($[M+H]^+$, m/z 235.1804) and 10-camphorsulfonic acid ($[M-H]^-$, m/z 231.0691) after cutoff of the low-intensity peaks (less than 500 counts).

Data processing for lipid data

The data matrix was generated using Makerlynx XS (Waters) using profiling data files recorded in the MassLynx format (raw). The data matrices were processed using an in-house Perl script. The original peak intensity values were divided with that of the internal standard (didecanoyl-*sn*-glycerophosphocholine at m/z 566.382 $[M + H]^+$ and at m/z 610.372 $[M + HCOO]^-$ for the positive and negative ion modes, respectively) to normalize the peak intensity values among the metabolic profile data.

Data processing for carotenoid and chlorophyll quantification

Peak picking, peak alignment, and quantification were performed using Shimadzu LCMSsolution software (version 5.41). The standard curve of each carotenoid and chlorophyll molecule was constructed using the following reference standards: neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, lycopene and chlorophyll A and B. Quantification was based on peak height at 450 nm (neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, and lycopene) and 650 nm (chlorophyll A and B). The data matrix exported from Shimadzu LCMSsolution software was normalized by

dividing each peak area by the peak area of the intensity of β -apo-8'-carotenal.

Statistical analysis

The multi-platform data were summarized using unifying metabolite identifiers and a common referencing scheme using the MetMask tool [7]. The four matrices were then concatenated and correlated peaks with the same annotation were replaced by their first principal component. All data were \log_2 or \log_{10} transformed prior to further analysis.

Principal component analysis (PCA) was performed on a unit-variance scaled metabolite matrix (observations, 40 samples; variables, 2,527 peaks) with \log_{10} transformation using SIMCA-P+ 13.0 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden).

ANALYTICAL CONDITIONS

Chemicals:

All chemicals and reagents used in this study were of spectrometric grade. Most of the chemicals were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) or Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan).

Sample amount:

For GC-MS analysis: an equivalence of 2.8 μg DW of the derivatized samples was injected.

For LC-MS analysis: an equivalence of 16.7 μg DW was injected.

For lipid analysis: an equivalence of 5 μg DW was injected.

For HPLC analysis: an equivalence of 80 μg DW was injected.

GC-TOF-MS conditions

One microliter of each sample was injected in the splitless mode by an CTC CombiPAL Autosampler (CTC analytics, Zwin-gen, Switzerland) into an Agilent 6890N Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Wilmington, US) equipped with a 30 m \times 0.25 mm inner diameter fused-silica capillary column with a chemically bound 0.25- μl film Rtx-5 Sil MS stationary phase (RESTEK, Bellefonte, US) for metabolome analysis. Helium (G1 grade, 99.999995%) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 ml/min. The temperature program for metabolome analysis started with a 2-min isothermal step at 80°C and this was followed by temperature ramping at 30°C to a final temperature of 320°C, which was maintained for 3.5 min. The transfer line and the ion source temperatures were 250 and 200°C, respectively. Ions were generated by a 70-eV electron beam at an ionization current of 2.0 mA. The acceleration voltage was turned on after a solvent delay of 273 s. Data acquisition was performed on a Pegasus IV TOF mass spectrometer (LECO, MI, US) with

an acquisition rate of 30 spectra/s in the mass range of a mass-to-charge ratio of $m/z = 60\text{--}800$. Alkane standard mixtures (C8–C20 and C21–C40) were purchased from Sigma–Aldrich (Tokyo, Japan) and were used to calculate the retention index (RI) [2, 3]. The normalized response used to calculate the signal intensity of each metabolite from the mass-detector response was obtained by each selected ion current that was unique in each metabolite MS spectrum to normalize the peak response. For quality control, methylstearate (SIGMA–Aldrich) was injected into every six samples. Data was normalized using the CCMN algorithm [4].

LC-q-TOF-MS conditions

After preparation, the extracts (1 μl) were analyzed using an LC-MS system equipped with an electrospray ionization (ESI) interface (LC, Waters Acquity UPLC system; MS, Waters Xevo G2 Q-Tof). The analytical conditions were as follows: LC, column, Acquity bridged ethyl hybrid (BEH) C18 (pore size, 1.7 μm ; length, 2.0×100 mm; Waters); solvent system, acetonitrile (0.1% formic acid):water (0.1% formic acid); gradient program, 99.5% A/0.5% B at 0 min, 99.5% A/0.5% B at 0.1 min, 20% A/80% B at 10 min, 0.5% A/99.5% B at 10.1 min, 0.5% A/99.5% B at 12.0 min, 99.5% A/0.5% B at 12.1 min and 99.5% A/0.5% B at 15.0 min; flow rate, 0.3 ml min^{-1} ; temperature, 40°C; MS detection; capillary voltage, +3.0 keV; cone voltage, 25.0 V; source temperature, 120 °C; desolvation temperature, 450°C; cone gas flow, 50 l/h; desolvation gas flow, 800 l/h; collision energy, 6 V; mass range, m/z 100–1500; scan duration, 0.1 s; interscan delay, 0.014 s; mode, centroid; polarity, positive; Lockspray (Leucine enkephalin): scan duration, 1.0 s; and interscan delay, 0.1 s. The data were recorded using MassLynx version 4.1 software (Waters).

LC-q-TOF-MS conditions for lipid analysis

Sample extracts (1 μl) were analyzed using an LC-MS system equipped with an electrospray ionization (ESI) interface (HPLC, Waters Acquity UPLC system; MS, Waters Xevo G2 Qtof). A two-solvent (A and B) system was used to separate each metabolite. The composition of these solvents was as follows: solvent A, acetonitrile : water : 1 M ammonium acetate : formic acid = (158 g : 800g : 10 ml : 1 ml); solvent B, acetonitrile : 2-propanol : 1 M ammonium acetate : formic acid = (79 g : 711 g : 10 ml : 1 ml). The analytical conditions were as follows: HPLC, column, Acquity UPLC HSS T3 (pore size, 1.8 μm ; 1.0 i.d \times 50 mm long; Waters); gradient program, 35% B at 0 min, 70% B at 3 min, 85% B at 7 min, 90% B at 10 min, 90% B at 12 min and 35% B at 12.5 min; flow rate, 0.15 ml min^{-1} ; temperature, 55°C; MS detection; capillary voltage, +3.0 kV; cone voltage, 20 V for positive mode and 40 V for negative mode; source temperature, 120°C; desolvation temperature, 450°C; cone gas flow, 50 l h^{-1} ; desolvation gas flow, 450 l/h; collision energy, 6 V; detection mode, scan (m/z 100–2000; scan time, 0.5 s; centroid). The scans were

repeated for 15 min in a single run. The data were recorded using MassLynx version 4.1 software (Waters).

HPLC conditions for carotenoid and chlorophyll quantification

Extracts (2 μ l, ca. 80 μ g of each sample) were analyzed using an LC-photodiode array (PDA) (LC, Shimadzu LC-20AD system; PDA, Shimadzu SPD-M20A) operated by Shimadzu LCMS solution software (version 5.41). A two-solvent system was used to separate each carotenoid and chlorophyll. The analytical conditions were as follows: Column, Develosil C30-UG (2.0 mm I.D., 250 mm long; Nomura chemical); solvent A, methanol (4.5% water and 0.1% triethylamine); solvent B, hexane/isopropyl alcohol (60:40, v/v, 0.1% triethylamine); gradient program, 1% B at 0 min, 1% B at 9 min, 6% B at 9.5 min, 7% B at 19 min, 18% B at 20 min, 20% B at 18 min, 34% B at 28 min, 48% B at 36 min, 100% B at 48.5 min, 100% B at 53.5 min, 1% B at 54 min (total run time, 60 min); flow rate, 0.37 ml/min; column temperature, 30°C.

DATA PROCESSING

Data processing for GC-MS data

Non-processed MS data from GC-TOF/MS analysis generated by chromatography processing and mass spectral deconvolution software, Leco ChromaTOF version 3.22 (LECO, St. Joseph, MI, USA) were exported in NetCDF format to MATLAB 6.5 (Mathworks, Natick, MA, USA), where all data-pretreatment procedures, such as smoothing, alignment, time-window setting and H-MCR, were carried out [5]. The resolved MS spectra were matched against reference mass spectra using the NIST mass spectral search program for the NIST/EPA/NIH mass spectral library (version 2.0) and our custom software for peak annotation written in JAVA. Peaks were identified or annotated based on retention indexes (RIs) and the reference mass spectra comparison to the Golm Metabolome Database (GMD; http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/msri/gmd_msri.html) released from CSB.DB [6] and our in-house spectral library. The metabolites were identified by comparison with RIs from the library databases (GMD and our own library) and with those of authentic standards, and the metabolites were defined as annotated metabolites on comparison with mass spectra and RIs from these two libraries.

Data processing for LC-MS data

The data matrix was aligned using MassLynx version 4.1 (Waters). The profiling data files were converted to the NetCDF format using the DataBridge function of the MassLynx software. After the processes of

alignment and deisotoping with the set of NetCDF data files, the data matrix was obtained.

For normalization, the intensity values of the remaining peaks were divided by those of lidocaine ($[M+H]^+$, m/z 235.1804) and 10-camphorsulfonic acid ($[M-H]^-$, m/z 231.0691) after cutoff of the low-intensity peaks (less than 500 counts).

Data processing for lipid data

The data matrix was generated using Makerlynx XS (Waters) using profiling data files recorded in the MassLynx format (raw). The data matrices were processed using an in-house Perl script. The original peak intensity values were divided with that of the internal standard (didecanoyl-*sn*-glycerophosphocholine at m/z 566.382 $[M + H]^+$ and at m/z 610.372 $[M + HCOO]^-$ for the positive and negative ion modes, respectively) to normalize the peak intensity values among the metabolic profile data.

Data processing for carotenoid and chlorophyll quantification

Peak picking, peak alignment, and quantification were performed using Shimadzu LCMSsolution software (version 5.41). The standard curve of each carotenoid and chlorophyll molecule was constructed using the following reference standards: neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, lycopene and chlorophyll A and B. Quantification was based on peak height at 450 nm (neoxanthin, violaxanthin, lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, and lycopene) and 650 nm (chlorophyll A and B). The data matrix exported from Shimadzu LCMSsolution software was normalized by dividing each peak area by the peak area of the intensity of β -apo-8'-carotenal.

STATISTICAL ANALYSIS

The multi-platform data were summarized using unifying metabolite identifiers and a common referencing scheme using the MetMask tool [7]. The four matrices were then concatenated and correlated peaks with the same annotation were replaced by their first principal component. All data were \log_2 or \log_{10} transformed prior to further analysis.

Principal component analysis (PCA) was performed on a unit-variance scaled metabolite matrix (observations, 40 samples; variables, 2,527 peaks) with \log_{10} transformation using SIMCA-P+ 13.0 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden).