誰でもできるアグロバクテリウム法による Micro-Tomトマトの形質転換

浅 芝 有 希

Ⅰ．はじめに

トマトなどを含むナス科植物は世界中に約90属2500種が分布しており、多様な生理活性を持つステロイドサポニンと呼ばれる化合物を合成することが知られている。ステロイドサポニンの中には、薬として用いられるものもあれば、例えばトマトの未熟果実に含まれるトマチンやジャガイモの芽に含まれるソラニンなど有毒なものも存在する。

ナス科植物のトマト（*Solanum lycopersicum*）は世界で最も多く栽培されており、年間約1億8百万トン生産されている主要な野菜作物であり、商業的に重要な作物である（Dan *et al.*, 2006）。トマトに含まれるトマチンは、地上部や未熟果実に多く、植物の防御機構に関与していると考えられている。また、がん細胞増殖抑制活性を持つ一方で、ヒトにとっては不快な苦みを持つ上に食中毒の原因となるためその生成や含有量を制御することは育種・薬学上重要である（Friedman *et al.*, 2009）。

このような作物としての重要性に加え、トマトはゲノムサイズが小さい（950Mb）、形質転換が可能であることから、遺伝学・発育学・病理学・生理学的知見がかなり蓄積されており、ナス科のモデル植物として利用されている。さらに、シロイヌナズナやイネなどの従来のモデル植物には見られないトマト独自の特徴として、作物として重要な形質の一つである果実を発達させる機構についてのモデル植物となりうる（Tsugane *et al.*, 2005;

Marti *et al*., 2006; Orzaez *et al*., 2006)。トマトを用いた研究のモデルとして、Micro-Tomという矮性品種が注目されている（Fig1)。Micro-Tomは個体が小さい（1357個体/m²)、ライフサイクルが短い（播種から70～90日で収穫可能）などの研究に有利な特徴を持つためである。

アグロバクテリウム法は植物体に遺伝子を導入する方法の一つで、アグロバクテリウムという植物病原性の土壌細菌を利用した手法である。アグロバクテリウムは植物が傷ついた部分から感染し、クラウンゴールという腫瘍を形成する特徴を持つ。クラウンゴールの形成には、アグロバクテリウムに存在するTiプラスミド（Tumor induced plasmid）が関与している。Tiプラスミド上には、宿主である植物細胞に遺伝子を導入するのに必要な遺伝子や、植物細胞に導入されるT-DNA領域などがある。T-DNAには植物ホルモンであるオーキシンとサイトカイニンの合成酵素遺伝子やオパイン（アグロバクテリウムのエネルギー源となるアルギニンの誘導体）の合成酵素遺伝子がコードされている。

植物は傷つけられると、防御応答としてフェノール化合物を合成する。このフェノール化合物によって、アグロバクテリウムのTiプラスミド上の病徴発現（*vir*）遺伝子群が活性化され、TiプラスミドからT-DNAが切り出される。切り出されたT-DNAは植物細胞に注入され、植物細胞の核染色体DNAに組み込まれる。T-DNA上のオーキシンとサイトカイニンの合成酵素遺伝子が発現することでクラウンゴールが形成される。また、オパインの合成酵素遺伝子の発現により、オパインを生産することでアグロバクテリウムの生存に有利な環境を築いている。

このようなアグロバクテリウムの性質を利用してT-DNAに目的の遺伝子を組み込むことによって、植物体内に目的の遺伝子を導入することができる。現在は、モデル植物であるシロイヌナズナやイネをはじめ様々な植物の形質転換がアグロバクテリウム法によって可能になっている

今回は、本研究で行ったナス科のモデル植物かつ、果実形成植物のモデル植物であるMicro-Tomトマトにおけるアグロバクテリウム法による形質転換を紹介する。

Fig1.　研究対象とした*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom
写真左：一般的に販売されているトマト品種「桃太郎」の果実。
写真右：野生型Micro-Tomの植物体。

Ⅱ．遺伝子組換えトマトの実用例

1　ミラクリン蓄積トマトの作出

アグロバクテリウム法により遺伝子組換えトマトが作成された研究例を紹介する。味を修飾するタンパク質として西アフリカ固有の灌木であるミラクルフルーツから単離されてきたタンパク質にミラクリンという物質がある。ミラクリンは、それ自体は甘くはないが酸味を甘みに変える性質を持っている。この性質から糖尿病患者への甘味料として期待されタブレット錠として製品化され市場では注目されている。しかし、天然物には限りがあるためミラクルフルーツに依存することなく、大量にミラクリンを得る方法が必要となっている。そこでミラクリン遺伝子を導入したトマトからミラクリンが抽出されている（Hyeon-Jin Sun *et al.*, 2007）。

アグロバクテリウムに35Sプロモーターで発現するミラクリン遺伝子をつないだベクターを導入した。このアグロバクテリウムをトマトの子葉に感染させ、選抜培地で4週間培養した。この植物体の葉からタンパク質を抽出し、サザンブロットにより導入したミラクリン発現が確認された。また、リコンビナントミラクリンからはミラクリンの性質である味覚修飾効果も確認された。

これらから、遺伝子組換えトマトによって味覚修飾効果のあるリコンビナントミラクリンが得られると共にこの生産システムは非常に有効であると判明した。特に、ミラクルフルーツのように有用価値が高く天然での生産に限度があるものに関して、それに打って変わる有効な手段になり得ると示唆されている。

２　アントシアニン蓄積トマトの作出

アントシアニンはフラボノイド系のポリフェノールであり、植物の重要な色素である。アントシアニンには抗酸化活性など多くの生理作用があり、先行研究で、がんや心疾患、糖尿病などに一定の効果があり、 肥満や糖尿病を防ぐ可能性があることが分かっている。これを用いて様々な健康食品などに応用されている。この研究では、アントシアニンを大量にトマトに蓄積させた。キンギョソウ由来のアントシアニン合成を誘導する2種類転写因子遺伝子であるDelila（*Del*）とRosea1（*Ros1*）をトマトにアグロバクテリウム法で導入し、過剰発現させた。作成した植物体はアントシアニンを大量に蓄積し、紫色のトマトの果実を着果した。このアントシアニンが蓄積し紫色の果実をつける形質は、トマト他の品種と交配させてもきちんと交雑品種にも遺伝することがわかった。

また、この紫色のトマトを実験用マウスに与えて抗がん作用を調査したところ、このトマトを与えたマウスは、普通のトマトを与えたマウスより

も大幅に寿命が伸びた。この結果から紫色のトマトの栽培研究は人びとの健康促進に貢献すると、示唆される。また、食生活による習慣病リスクの軽減と健康促進を示した代謝工学分野での初めての実例であり、 遺伝子組換え作物人々にとって有益となる可能性を示唆している。(Eugenio Butelli *et al.*, 2008)

Ⅲ．実験プロトコール

Micro-tomでのアグロバクテリウム法による形質転換は（1）無菌播種、（2）感染実験、（3）選抜培養１、（4）選抜培養２、（5）選抜培養３，（6）順化の6段階を経る。

（1）無菌播種

1）Micro-Tomの種子を5cm四方のガーゼで包み、針金で固定する。

2）50mLチューブに入れ70%エタノールに2分間浸する。

3）70%エタノールを捨て滅菌液（20％花王ハイター）に浸し、15分間振とう

4）滅菌水で泡が切れるまで洗浄する。

5）滅菌水に12～16時間浸し吸水させる。

6）滅菌済みキムタオルで余分な水分を除去する。

7）播種用Murashige and Skoog（MS）培地に播種。

8）25℃、長日条件下（16時間明所／8時間暗所）で生育させた。(Fig2A)

①滅菌液組成

キッチンハイター（花王）	3mL
滅菌水	27mL
Total	30mL

②播種用MS培地組成（1L）

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM Including Vitamins	4.4g
(Duchefa Biochemie B.V. M0222.0010)	
Sucrose	15g
ジェランガム（関東化学17611-13)	3g
1N NaOH	適量（pH 5.8に調整)
Milli-Q水	to 1L
Total	1L

（2）感染実験

1）目的のプラスミドDNAを保持する*A. tumefaciens*のグリセロールストック10μLを終濃度50μg/mLのカナマイシン硫酸塩を含むLB液体培地2mlに加える。

2）28℃、180rpmで24-28時間培養する。

3）4℃、5,000rpm、5分間遠心分離をする。

4）液体培地を取り除く。

5）終濃度100μMのアセトシリンゴン、10μMの2-メルカプトエタノールをMS液体培地に加える。

6）5）のMS液体培地を用いて、OD_{600}＝0.18の菌懸濁液を調製する。

7）無菌播種し7～10日間生育させたMicro-Tomの子葉をハサミで切断して外植片にする。

＊この時、葉の葉脈に対して垂直に切断することが重要である。

8）6）のアグロバクテリウム懸濁液に外植片を10分間浸す。

9）余分なアグロバクテリウム懸濁液を滅菌済みキムタオルで除去し、共培養培地に外植片を乗せた。

＊葉の表側を共培養培地に接触させた状態（下側に向けて）で置床

すること。

10）25℃、暗所でアグロバクテリウムの増殖が視認できるまで共培養する。

①共培養培地組成（1L）

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM Including Vitamins (Duchefa Biochemie B.V. M0222.0010)	4.4g
Sucrose	30g
ジェランガム（関東化学17611-13）	3g
1N NaOH	適量（pH 5.8に調整）
Milli-Q水	to 1L
Total	1L

↓

121℃、20分間、オートクレーブ滅菌

↓

trans-Zeatin（Wako 261-00951）	1.5mg/L（終濃度）
アセトシリンゴン	40 μM（終濃度）

↓

各シャーレに30mLずつ分注

②アセトシリンゴン…3’,5’-Dimethoxy-4’-hydroxyacetophenone; SIGMA D134406）

③2-メルカプトエタノール…2-メルカプトエタノール; nacalai tesque 21418-42

（3）選抜培養１…カルス誘導

１）共培養を行った外植片をカルス誘導培地に移植する。

＊この時は、葉の表側を上にする。

＊アグロが浸食し、褐色に変色したものに関しては破棄する。

2）25℃、長日条件下（16時間明所／8時間暗所）で培養する。

3）カルスおよびシュートが形成されるまで2週間ごとに新しいカルス誘導培地に移し変える。(Fig2B)

＊シュートができるまではカルス誘導培地に移し続ける。

①カルス誘導培地組成（1L）

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM Including Vitamins (Duchefa Biochemie B.V. M0222.0010)	4.4g
Sucrose	30g
ジェランガム（関東化学17611-13）	3g
1N NaOH	適量（pH 5.8に調整）
Milli-Q水	to 1L
Total	1L

↓

121℃、20分間、オートクレーブ滅菌

↓

trans-Zeatin	1.5mg/L（終濃度）
カナマイシン硫酸塩	100mg/L（終濃度）
オーグメンチン（GlaxoSmithKline GS609）	375mg/L（終濃度）

↓

各シャーレに40mLずつ分注

（4）選抜培養2 …シュート伸長

1）選抜培養1にてカルスからシュートの形成が確認できたら、シュートが形成されたカルスをシュート伸長培地に移植する。

＊カルスが部分的に褐変した際はその部分だけメスで切り落とすと良い。

2）25℃、長日条件下（16時間明所／8時間暗所）で培養する。

＊その際、シュートの成長を考え、シャーレの底同士で蓋をし、シャーレの高さを上げる。

3）また、シュートが十分に伸長するまで2週間ごとに新しいシュート伸長培地に移し変えた。(Fig2C)

①シュート伸長培地組成（1L）

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM Including Vitamins	
(Duchefa Biochemie B.V. M0222.0010)	4.4g
Sucrose	30g
ジェランガム（関東化学17611-13)	3g
1N NaOH	適量（pH 5.8に調整)
Milli-Q水	to 1L
Total	1L

↓

121℃、20分間、オートクレーブ滅菌

↓

trans-Zeatin	1.0mg/L（終濃度)
カナマイシン硫酸塩	100mg/L（終濃度)
オーグメンチン（GlaxoSmithKline GS609)	375mg/L（終濃度)

↓

各シャーレに40mLずつ分注

（5）選抜培養3 …発根選抜

1）メスを用いてカルスからシュートを切り離し、シュートを発根培地に移植する。

＊シュートは本葉が少しできていれば、切り離して移植しても問題ない。

2）25℃、長日条件下（16時間明所／8時間暗所）で培養する。

＊その際、シュートの成長を考え、シャーレの底同士で蓋をし、シャーレの高さを上げる。

3）シュートから発根が確認できるまで2週間ごとに新しい発根培地に移し変える。(Fig2D)

＊未発根のシュートを新しい発根培地に移し変える際には、滅菌済みのメスを用いてシュートの底面を薄く切除する。

＊この操作を、シュートから発根が確認できるまで3回繰り返し行い、発根が確認できなかったシュートは破棄する。

＊また、一度発根してもその後シュートの根元部分を切り移植し発根培地で発根が確認できないものも破棄をする。

①発根培地組成（1L）

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM Including Vitamins (Duchefa Biochemie B.V. M0222.0010)	2.2g
Sucrose	15g
ジェランガム（関東化学17611-13）	3g
1N NaOH	適量（pH 5.8に調整）
Milli-Q水	to 1L
Total	1L

↓

121℃、20分間、オートクレーブ滅菌

↓

カナマイシン硫酸塩	50mg/L（終濃度）
オーグメンチン（GlaxoSmithKline GS609）	375mg/L（終濃度）

↓

各シャーレに40mLずつ分注

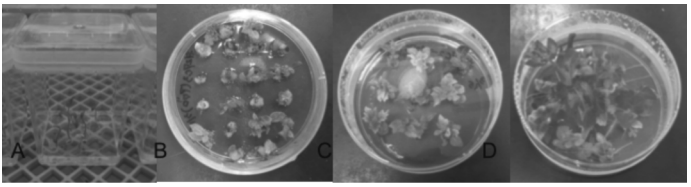

Fig2　アグロバクテリウム法による形質転換の手法

A：無菌播種後感染に用いるMicro-Tomの子葉　B：選抜培養1カルス化誘導中のMicro-Tom

C：選抜培養2シュート伸長中のMicro-Tom　D：選抜培養３発根誘導中のMicro-Tom

（6）馴化

形質転換の確認が出来た再生個体を水で湿らせた「かんたんさし芽タネまきの土」とバーミキュライト（バーンピース; 白元）の混合土を入れた鉢に移植した後、25℃、長日条件下（16時間明所／8時間暗所）で、湿度管理に注意し、生育した。

＊根が張るまではラップなどを被せると湿度を保てて枯死の可能性を下げることができる。

（7）導入遺伝子の確認

（7）－1　Genomic PCRのためのDNA抽出。

1）選抜培養3にてシュートから発根が確認できたMicro-Tomの再生個体の葉を１枚切り取る。

2）抽出バッファーを400μL加え、ピペットでよく潰しVOLTEXで懸濁する。

3）4℃、13,000rpm、5分間遠心分離する。

4）上清（300μL）を新しい1.5mLチューブに移す。

5）当量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコールを加え、VOLTEXでよく懸濁する。

6）4℃、13,000rpm、5分間遠心分離する。

7）上層（300μL）を新しい1.5mLチューブに移す。

8）当量のクロロホルム：イソアミルアルコール（24:1）を加え、VOLTEXでよく懸濁した。4℃、13,000rpm、5分間遠心分離する。

9）上層（200μL）を新しい1.5mLチューブに移す。

10）当量のイソプロパノールを加え、数回転倒撹拌した。4℃、13,000rpm、5分間遠心し、ペレットを確認後、イソプロパノールを除去しする。

11）1mLの75%エタノールを加え、数回転倒撹拌する。

12）4℃、13,000rpm、5分間遠心分離し、75%エタノールを除去する。

13）チューブの蓋を開けた状態で室温に5分間程度置きペレットを乾燥させる。

14）100μLのTE Bufferを加えた後、ピペッティングによってペレットを溶解させる。

15）30℃で保存。

①抽出バッファー組成（40mL）

1M Tris-HCl（pH 7.5）	8mL
5M NaCl	8mL
0.5 M EDTA（pH 8.0）	2mL
10% SDS	2mL
H_2O	26mL
Total	40mL

②クロロホルム：イソアミルアルコール　24：1組成（25mL）

イソアミルアルコール	24mL
（3-メチル-1-ブタノール; nacalai tesque 02715-4）	

クロロホルム（Wako 038-02606）	1mL
Total	25mL

③フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール 25：24：1、pH 7.9 (nacalai tesque 25970-56)

④イソプロパノール (2-プロパノール; Wako 166-04836)

（7）－2　Genomic PCR

上記の方法で得られたゲノムDNA溶液を鋳型としてPCRを行うことで4-4にて得られた再生個体への目的遺伝子の導入を確認する。

PCR後に2％アガロースゲルにサンプルをアプライし電気泳動を行いバンドを確認する。

①反応液組成

Quick Taq HS DyeMix（TOYOBO）	5μL
Forward primer（10μM）	1μL
Reverse primer（10μM）	1μL
滅菌水	2.5μL
DNA抽出液	0.5μL
Total	10μL

②PCR条件

①94℃	2分間	
②94℃	30秒間	②～④を35サイクル
③55℃	30秒間	
④68℃	1分間	
⑤68℃	5分間	
⑥4℃	∞	

Ⅳ　ナス科植物トマトへの応用

本研究室で行われたトマトへの応用例として、マメ科植物カンゾウのグリチルチリン生合成遺伝子を導入した遺伝子組換えトマトの作出について紹介する。

マメ科植物のカンゾウの地下茎（ストロン）には炭素数30のトリテルペンの一種であるβ-amyrinを基本骨格に持つグリチルリチンというトリテルペノイドサポニンが蓄積している。グリチルリチンは、抗炎症作用、抗潰瘍活性（Gibson,　1978,; Shibata, 2000）などの多様な薬理作用を持つことから、医薬品原料として用いられる一方、砂糖の150～300倍の甘さをもつため（Blumenthal *et al.*, 2000）食品添加物としても利用されている。一般にカンゾウ属植物の地下部を乾燥したものは甘草と呼ばれ、日本薬局方に記載されている漢方処方の70%以上に配合される重要な生薬である。そのため、甘草の世界市場における年間輸出額は4200万ドルに上り、生産量は年間7～8万トンと見積もられている。

しかし、甘草の供給は、自生する野生品に多くを依存しているのが現状である。1kgのカンゾウを採取すると5m^{2}の草原が破壊されると報告されており、近年、大生産地である中国では乱獲による生育地の砂漠化およびグリチルリチン含量が高い優良品の減少が問題となっている。また、日本国内では厚生労働省関連の研究機関が中心となってカンゾウ栽培に向けた研究が行われ、栽培技術は向上しているものの、薬局方規定の2.5%以上のグリチルリチン含量の基準を満たすことは容易ではない状況である（Seki *et al.*, 2008a）。このような背景から、高グリチルリチン含量品種の育成や分子育種などによるグリチルリチン生産など、今後の安定供給に向けた取り組みが望まれている。

グリチルリチンは、メバロン酸経路を経て合成される2,3-oxidosqualeneを

前駆体として、β-amyrin synthase（bAS）によって生成されるトリテルペンであるβ-amyrinを最初の環状中間体とする。次に、β-amyrinが11位の2段階の酸化を受け11-oxo-β-amyrinが産生された後、30位の3段階の酸化を受けグリチルリチンのアグリコンに相当するグリチルレチン酸が生成し、さらに、3位水酸基への配糖化を受けグリチルリチンが生合成されると考えられる（Fig3）。

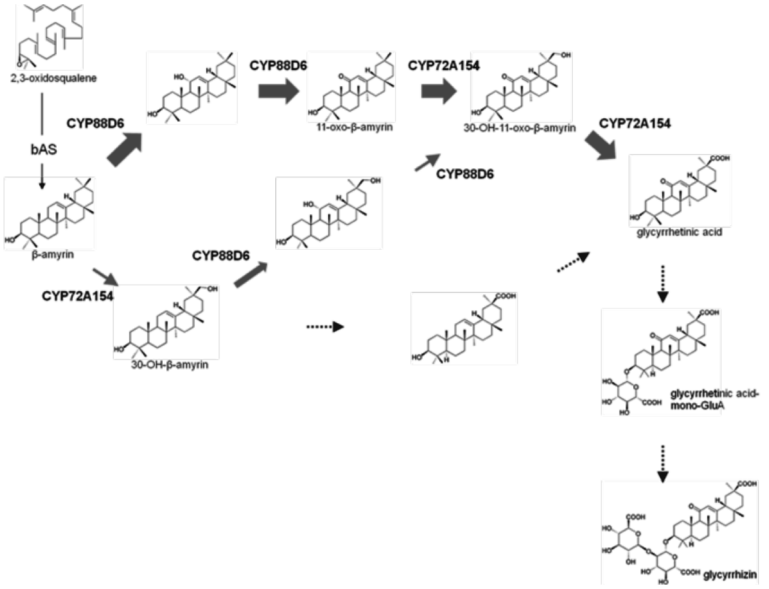

Fig3.　グリチルリチン生合成経路

赤い矢印はCYP88D6あるいはCYP72A154によって触媒される反応ステップ。点線は未確定な経路。

これら二つのP450遺伝子をβ-アミリン合成酵素遺伝子と同時に酵母で発現させた際には、グリチルレチン酸の生成が確認された。（大山、博士論文 2009）

先行研究によって、β-amyrinの11位の2段階の酸化反応を触媒するCYP88D6、さらにこの反応によって産生された11-oxo-β-amyrinの30位の酸化反応を触媒するCYP72A154、この2種類のシトクロムP450モノオキシゲナーゼ（P450）をコードする遺伝子がウラルカンゾウからすでにクローニングされている（Seki *et al.*, 2008a; 大山、博士論文 2009; Seki *et al.*,2011）。

ナス科植物に含まれるステロイドサポニンと、マメ科植物に含まれるトリテルペンサポニンはどちらも2,3-oxidosqualeneを共通の前駆体とし、その後分岐することで生合成されている（Fig4）。そこで本研究ではこの点に着目し、トマトに代表されるナス科植物においてステロイドサポニン生合成に消費される2,3-oxidosqualeneを、遺伝子導入により再構築したトリテルペンサポニン生合成経路にリダイレクトすることにより、ナス科植物に含まれる食品にとって不要なステロイドサポニンを除去し、替わりにグリチルリチンなどの有用トリテルペンサポニンを含んだ高機能性植物体を作出することができるのではないかと考えた。

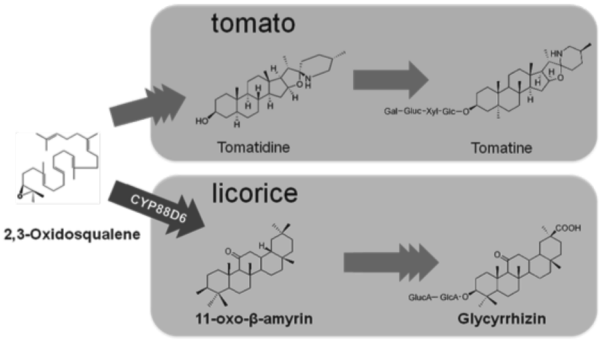

Fig4.　トマチンおよびグリチルリチン生合成経路
トマチンおよびグリチルリチンは2,3-Oxidosqualeneを共通の前駆体として、共に数段階の反応を経ることでそれぞれが生合成される。

実際に、*CYP88D6*高発現コンストラクトとコントロールとしてGUSレポーター遺伝子発現コンストラクトを構築し、アグロバクテリウム法を用いてMicro-Tomに遺伝子導入を試みた結果、37個体の*CYP88D6*遺伝子導入Micro-TomがRT-PCRによって確認できた。これらの個体には形質に顕著な差は見られなかった。今後は、2,3-oxidosqualeneからβ-amyrinを合成するβ-amyrin合成酵素（bAS）遺伝子などグリチルリチン生合成遺伝子を共にMicro-Tomに導入することでよりグリチルリチンが蓄積した高機能性植物体の作出が期待できる。

これらの技術を活用していくことで、高機能性植物体の創出や、日本国内で医薬品原料および食品添加物として消費されるグリチルリチンの安定供給につながる可能性があるだろう。

Ⅴ　謝辞

本研究に際し、トリテルペン代謝改変形質転換作物の作出を指導してくださった大阪大学大学院工学研究科先端生命工学専攻　村中俊哉教授、關光准教授に心より御礼申し上げます。

さらに、本研究を進めるにあたり、直接御指導頂きました一色正之准教授に厚く御礼申し上げます。そして多くのご指導ご指摘をくださいました植物応用ゲノム科学部門の皆様に感謝申し上げます。

Ⅵ　引用文献

1. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckmann J(2000): Herbal medicine: Expanded Commission E Monorgaphs. Newton,233-36

2. Charles M. Rick, John W. Uhlig and A. Daniel Jones (1994). High α-tomatine content in

ripe fruit of Andean *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*: Developmental and genetic aspects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 12877-12881

3. Colleen G. Santino, Gail L. Stanford and Timothy W. Conner (1997). Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes. Plant Molecular Biology. 33: 405-416
4. David Liénard, Christophe Sourrouille, Veronique Gomord and Loïc Faye (2007). Pharming and transgenic plants. Biotechnology Annual Review. Vol.13: 115-147
5. Diego Orzaez, Sophie Mirabel, Willemien H. Wieland and Antonio Granell (2006). Agroinjection of Tomoto Fruits. A Tool for Rapid Functional Analysis of Transgenes Directly in Fruit. Plant Physiology. 140: 3-11
6. Esmeralda Marti, Carmina Gisbert, Gerard J. Bishop, Mark S. Dixon and Jose L. Garcia-Martinez (2006). Genetic and physiological characterization of tomato cv. Micro-Tom. Jornal of Experimental Botany. vol. 57, No.9: 2037-2047
7. Gibson MR(1978).: Glycyrrhiza in old and new perspective. Lloydia 41:348-54
8. Hyeon-Jin Sun, Sayaka Uchii, Shin Watanabe and Hiroshi Ezura (2006). A Highly Efficient Transformation Protocol for Micro-Tom, a Model Cultivar for Tomato Functional Genomics. Plant Cell Physiol. 47(3): 426-431
9. Hikaru Seki, Kiyoshi Ohyama, Satoru Sawai, Masaharu Mizutani, Toshiyuki Ohnishi, Hiroshi Sudo, Tomoyoshi Akashi, Toshio Aoki, Kazuki Saito and Toshiya Muranaka (2008a). Licorice β-amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(37): 14204-9
10. Hikaru Seki, Kiyoshi Ohyama, Tomoko Nishizawa, Shigeo Yoshida and Toshiya Muranaka (2008b). The "all-in-one" *rol*-type binary vectors as a tool for functional genomics studies using hairy roots. Plant Biotechnology. 25: 347-355
11. Kazuhisa Kato, Riichiro Yoshida, Ayako Kikuzaki, Tadayoshi Hirai, Hirofumi Kuroda, Kyoko Hiwasa-Tanase, Kenichi Takane, Hiroshi Ezura, and Tsuyoshi Mizoguchi (2010). Molecular Breeding of Tomato Lines for Mass Production of Miraculin in a Plant Factory. J. Agric. Food Chem. 58: 9505-9510
12. Mendel Friedman and Carol E.Levin (1995). α-Tomatine Content in Tomato and Tomato Products Determined by HPLC with Pulsed Amperometric Detection. J. Agric. Food Chem. 43: 1507-1511
13. Mendel Friedman, Carol E. Levin, Seung-Un Lee, Hyun-Jeong Kim, In-Seon Lee, Jae-

Oke Byun and Nobuyuki Kozukue (2009). Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells. J. Agric. Food Chem. 57: 5727-5733

14. Okada Yoshimi (1997). Transgenic plants as medicine production systems. Nippon Yakurigaku Zasshi. oct;110 Suppl 1: 1-6
15. Pamela Dunsmuir and Jamie S. Stott (1997). P119 promoter and their uses. United States Patent. 5,633,440
16. Robert E. Hoagland (2009). Toxicity of tomatine and tomatidine on weeds, crops and phytopathogenetic fungi. Allelopathy Journal. 23 (2): 425-436
17. Shibata S. (2000): A drug over millennia: Pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. Yakugaku Zasshi 120: 849-62
18. Taneaki Tsugane, Manabu Watanabe, Kentaro Yano, Nozomu Sakurai, Hideyuki Suzuki and Daisuke Shibate (2005). Expression sequence tags of full-length cDNA clones from the miniature tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Micro-Tom. Plant Biotechnology. 22 (2): 161-165
19. Yinghui Dan, Hua Yan, Tichafa Munyikawa, Jimmy Dong, Yanling Zhang and Charles L. Armstrong (2006). MicroTom-a high-throughput model transformation system for functional genomics. Plant Cell Rep. 25: 432-441
20. Hyeon-Jin, Hiroshi Kataoka, Megumu Yano and Hiroshi Ezura (2007). Genetically stable expression of functional miraclin, a new type of alternative sweetener, in transgenic tomato plants. Plant Biotecnology Journal.5,768-777
21. Hikaru Seki, Satoru Sawai, Kiyoshi Ohyama, Masaharu Mizutani, Toshiyuki Ohnishi, Hiroshi Sudo, Ery Odette Fukushima, Tomoyoshi Akashi, Toshio Aoki, Kazuki Saito and Toshiya Muranaka (2011). Triterpene Functional Genomics in Licorice for Identification of CYP72A154 Involved in the Biosynthesis of Glycyrrhizin. The Plant Cell 23 ß(11) 4112-4123
22. Eugenio Butelli, Lucilla Titta, Marco Giorgio, Hans-Peter Mock, Andrea Matros, Silke Peterek, Elio G W M Schijlen, Robert D Hall, Arnaud G Bovy, Jie Luo & Cathie Martin (2008)
    Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. Nature Biotechnology 26, 1301 - 1308
23. 大山　清（2009)、千葉大学大学院博士論文、「植物トリテルペンの生合成研究：分子遺伝学的研究資源を活用した有機化学的解析」

24. 久保　みづき（2011)、横浜市立大学大学院修士論文、「トマトにおけるステロイドサポニンの代謝改変に向けた配糖化酵素遺伝子の単離・機能解析」
25. 平岡　靖子（2009)、横浜市立大学卒業論文、「薬用植物カンゾウのトリテルペンサポニン生合成遺伝子の発現制御機構の解析」