

## プロテオーム解析によるイチゴヘタ離れ因子の探索

阿部 竜也, 高橋 徹

### Proteomic Analysis of Capping Factor in Strawberry

Tatsuya Abe and Toru Takahashi

The strawberry cultivar ‘Benihibari’ has a unique trait called ‘capping trait’. The fruits of ‘Benihibari’ can be easily detached from calyx, it is very useful for laborsaving in harvest. But, yield of ‘Benihibari’ was very low. The heritability of capping trait in strawberry is high, so capping trait seems to be mainly controlled by genetic factors. However, cultivated strawberry has octoploid genome, it is difficult to identify gene involved in capping trait by forward genetics analysis. Thus, we attempted to identify the gene by proteomic analysis.

We compared the protein of different capping traits, as easy (‘Benihibari’ mature fruits) and hard (‘Benihibari’ immature fruits and ‘Houkouwase’ mature fruits). Extracted Protein from each calyx was separated by two-dimensional gel electrophoresis and identified with ESI-MS/MS method.

Eighty-four proteins were differentially expressed between different capping traits. S-adenosylmethionine synthase, involved in ethylene synthesis, was included in ‘Benihibari’ ripe fruits. In addition, Malic enzyme was also included, that has been reported to increase gene expression with ethylene accumulation. On the other hand, biosynthetic enzymes of cellulose and lignin were included in proteins from ‘Benihibari’ immature fruits and ‘Houkouwase’ mature fruits.

These result suggested that increased ethylene production caused softening of calyx tissue in ‘Benihibari’ ripe fruits, therefore it was prone to capping trait.

**Key words:** Strawberry, Proteome, Capping, Ethylene

当研究所で育成された加工用イチゴ (*Fragaria × ananassa* Duch.) 品種 ‘ベニヒバリ’ は、かつて主流であった加工用品種 ‘アメリカ’ (マーシャルとも呼ばれる) を母、生食用品種 ‘宝交早生’ を父として、交配・選抜された品種である。‘ベニヒバリ’ 果実は鮮やかな赤色を有し、果実硬度が高いため、ジャムに加工した際の色調とブレザーブスタイルジャムで重要な粒残りが良好である。さらに、果実を持って引っ張るだけで果実のみを収穫できる (ヘタは株の方に残る) 「ヘタ離れ形質」を持っており、ヘタ離れ率は80%以上と非常に高い。この高いヘタ離れ率により、収穫時の作業性に優れ、さらに加工品への異物混入を阻止できる。そのため、ヨーロッパではヘタ離れ形質を重要視する傾向が強く、ドイツ・オランダ・デンマークではヘタ離れ性の高い加工用品種の作出が育種目標の1つとして掲げられていた時期もあった<sup>1)</sup>。しかし、‘アメリカ’と比べて果実がやや小さく着果数も少ないため、加工用品種において最も重要な形質である一株当たりの収量が低いという欠点があった<sup>2)</sup>。

‘ベニヒバリ’を用いた交配実験より、イチゴのヘタ離れ形質の遺伝率は高く、遺伝的要因によって制御されると推測された<sup>3)</sup>。しかし、ヘタ離れの機構や関与する遺

伝子についてはほとんど研究されていない。また、イチゴは8倍体であり、 $2n=8x=56$ 本の染色体を持ち、遺伝様式が複雑であるため、従来の交配を主軸とした遺伝学的なアプローチではヘタ離れに関与する因子の特定が困難である。近年、生体内機能を担うタンパク質を、細胞レベルで網羅的に解析するプロテオーム解析 (プロテオミクス) が医学・生物学・農学など幅広い分野で始められている。そこで、‘ベニヒバリ’を中心にプロテオーム解析を行い、イチゴのヘタ離れに関与するタンパク質の探索とヘタ離れ機構の解明を試みた。

### 材料および方法

#### 1. 材料

イチゴは ‘ベニヒバリ’ および ‘宝交早生’ の2品種を用いた。当所農場にて露地栽培し、2008年5~6月に果実を収穫した。果実全体が赤くなっているものを成熟果実、それ以外を未成熟果実とした (図1)。ヘタ離れ性の高い試料として、‘ベニヒバリ’ 成熟果実、ヘタ離れ性の無い試料として、‘ベニヒバリ’ 未成熟果実および ‘宝交早生’ 成熟果実を用いた。収穫した果実は、ヘタ部と果実部に分

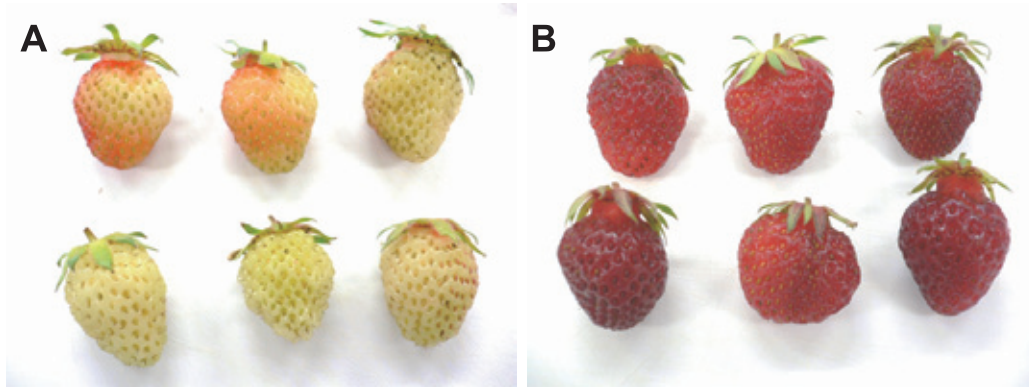


図1 ‘ベニハバリ’ 果実

A: 未成熟果、B: 成熟果

け、液体窒素で急速冷凍した後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## 2. タンパク質の抽出

イチゴ果実は多糖類やフェノール化合物を多く含んでいるため、煩雑ではあるが、精製度の高いタンパク質が得られる酢酸アンモニウム含有メタノール沈殿法を用いた。凍結試料を液体窒素中で粉末状にまで粉碎した後、Zhengらの方法<sup>4)</sup>に準じて、試料1gを4mlの抽出緩衝液(0.5 M Tris-HCl pH 8.5, 50 mM EDTA, 0.1 M KCl, 0.7 M スクロース, 1% PVPP, 1 mM フェニルメチルスルフォニルフロリド, 2.5 mM ジチオトレイトール (DTT))に懸濁後、同量のTE飽和フェノールを添加し、タンパク質抽出液を調製した。ここに5倍量の0.1 M 酢酸アンモニウム含有メタノールを添加し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で一晩静置してタンパク質を沈殿させた。沈殿したタンパク質を遠沈により回収し、アセトンで2回洗浄した後、残渣中のアセトンを揮発させてから、タンパク質溶解緩衝液(7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 4% CHAPS, 10 mM DTT)に溶解した。抽出したタンパク質の定量には、2D-Quant Kit (GEヘルスケア社)を用いた。また、定量時の標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

## 3. 電気泳動

二次元電気泳動には、Multiphor II 電気泳動装置 (GEヘルスケア社)を用いた。等電点電気泳動(1次元目電気泳動)用ゲルにはプレキャストゲルであるImmobiline DryStrip IPGゲル (GEヘルスケア社)を使用した。等電点電気泳動終了後のゲルを、1% DTTまたは2.5% ヨードアセトアミドを含む平衡化緩衝液(1.5 M Tris-HCl pH 8.0, 6 M 尿素, 30% グリセロール, 2% ドデシル硫酸ナトリウム)で、それぞれ30分間穏やかに浸透しゲルの平衡化を行った。平衡化したゲルをExcelGel (GEヘルスケア社)上に載せ、二次元目電気泳動を行った。分解能を向上させるため、一次元目電気泳動にはpH 4~7, 6~10の2種類のIPGゲルを用いた。二次元目電気泳動後に0.25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) 染色液で一

晩ゲルを染色後、脱染色液(25% メタノール, 7.5% 酢酸)でバックグラウンドの染色を除いた。二次元電気泳動の操作は全て $25^{\circ}\text{C}$ 下で行った。

## 4. タンパク質発現解析

タンパク質を二次元展開した後のゲルをGT-X900 (EPSON社)を用いてスキャンし、画像データを取得した。得られた画像データからImageMaster 2D Platinum (GEヘルスケア社)を用いてタンパク質スポットの解析を行った。同一試料タンパク質から3枚の独立した泳動ゲルを取得し、それらの画像データを統合して各種試料データとした。各試料間におけるスポットを解析し、染色面積・濃度に応じた数値を比較し、2倍以上の差があるものを発現パターンに差があるスポットとして選択した。また、‘ベニハバリ’成熟果のみで発現がみられたタンパク質スポットを「ヘタ離れ促進候補タンパク質」、‘ベニハバリ’未成熟果および‘宝交早生’成熟果で共通に検出され、‘ベニハバリ’成熟果では検出されなかったスポットを「ヘタ離れ抑制候補タンパク質」として扱った。

## 5. タンパク質の質量分析

発現差異のあるスポット(複数のタンパク質が含まれている)を切り出し、プロテアーゼ(トリプシン)を用いたin gel digestion法(ゲル内消化法)によって、タンパク質をペプチド(50以下のアミノ酸から構成)に断片化し、質量分析の試料とした。質量分析はLTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific社)を用いESI-MS/MS法で行った。得られた質量分析データからアミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列を持つタンパク質をタンパク質データベースから検索した。従って、そのアミノ酸配列を持つイチゴ由来タンパク質がデータベースに登録されていない場合には、配列が類似した他の植物種のタンパク質が検出される。尚、アミノ酸配列およびタンパク質の検索にはMascot search データベース (<http://www.matrixscience.com/>)を用いた。二つ以上のアミノ酸配列数が一致したタンパク質を同定タンパク質とした。

## 6. タンパク質の機能推定

質量分析より得られたタンパク質情報から, BLAST search (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) によりシロイヌナズナの相同遺伝子を検索した. 得られたホモログの情報を基に GO データベース (Gene Ontology; 文献情報に基づきタンパク質などの遺伝子産物に対して機能情報を付加しているデータベース) により生体内機能を推定し分類した.

## 結 果

### 1. タンパク質の発現比較

イチゴのヘタ部から抽出したタンパク質を二次元電気泳動により展開し, 品種, 熟度が異なる果実の間でタンパク質の発現比較を行った. pH 4-7 のゲルで分画した試料タンパク質を酸性側, pH 6-10 で分画したタンパク質を塩基性側タンパク質とした (図 2). 酸性側タンパク質では, のべ 1373 個のタンパク質スポットを比較し, その結果, 9 個のタンパク質スポットが 'ベニヒバリ' 成熟果で特異的に発現しており, これらをヘタ離れ促進候補タンパク質とした. 一方, 4 個のタンパク質スポットが 'ベニヒバリ' 成熟果で特異的に発現が抑えられていたため, こちらはヘタ離れ抑制候補タンパク質とした. また, 塩基性側タンパク質では, のべ 685 個のタンパク質スポットを比較し, ヘタ離れ促進候補タンパク質として 8 個, ヘタ離れ抑制候補タンパク質として 3 個のタンパク質スポットをそれぞれ選定した (表 1).

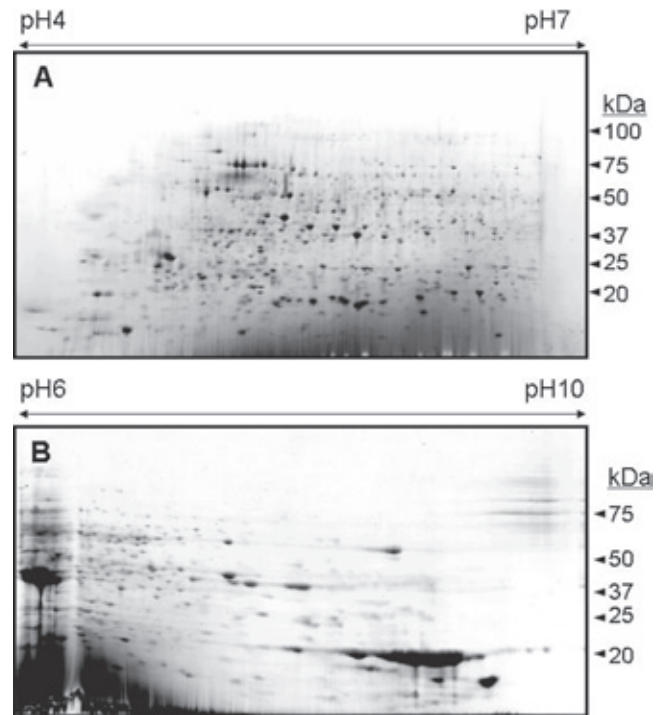


図 2 'ベニヒバリ' 成熟果実のヘタ部より抽出したタンパク質の二次元電気泳動像

A: 酸性側タンパク質 (pH 4-7)

B: 塩基性側タンパク質 (pH 6-10)

表 1 品種・熟度の異なるイチゴ果実ヘタ部から抽出したタンパク質の発現比較

| タンパク質の等電点      | 解析したスポット数 | ヘタ離れ促進候補 | ヘタ離れ抑制候補 |
|----------------|-----------|----------|----------|
| 酸性側 (pH 4-7)   | 1,373     | 9        | 4        |
| 塩基性側 (pH 6-11) | 685       | 8        | 3        |

### 2. タンパク質の発現比較およびタンパク質の質量分析

酸性側タンパク質において発現差異がみられた 13 個のタンパク質スポットを ESI-MS/MS 法にて分析した (図 3). その結果, 一つのタンパク質スポットから平均 7 種類のタンパク質が検出され, ヘタ離れ促進候補タンパク質 69 個, ヘタ離れ抑制候補タンパク質 46 個の計 115 個のタンパク質 (重複している物も含む) が同定された. これらのうち, ヘタ離れ促進・抑制候補両群に含まれているものを除外すると, ヘタ離れ促進候補に固有なタンパク質は 50 個, ヘタ離れ抑制候補に固有なタンパク質は 34 個となった. 同定されたタンパク質の登録情報を植物種毎に分類するとブドウ・イチゴ由来の情報が多く, 合わせて 40% 程度であった (図 4).

### 3. 同定タンパク質の分類

質量分析から, ブドウ・イチゴ由来のタンパク質が多く

同定されたが, これらの種における情報はアミノ酸配列情報のみであり, タンパク質の機能情報は十分ではなかった. そこで, タンパク質の機能情報および知見が豊富なシロイヌナズナに着目し, 各タンパク質におけるシロイヌナズナの相同遺伝子を BLAST search により探索した. 得られた相同遺伝子の情報を基に GO データベースにより生体内機能および組織内局在性を推定し分類した.

生体内機能推定から, ヘタ離れ促進候補タンパク質群では, 果実の成熟や器官脱離を促進する植物ホルモンであるエチレンの生合成酵素タンパク質である S-Adenosyl Methioine synthase (SAM 合成酵素) が含まれていた (GenBank ID (gi):100801530). 更に, 果実追熟時にエチレンによって引き起こされる呼吸量増加に関与するリンゴ酸脱水素酵素 (gi:1708924,118487388) やピルビン酸脱炭酸酵素 (gi:10121330) も含まれていた. また, 全体としては環境応答関連タンパク質 (熱・低温・塩ストレス応答な

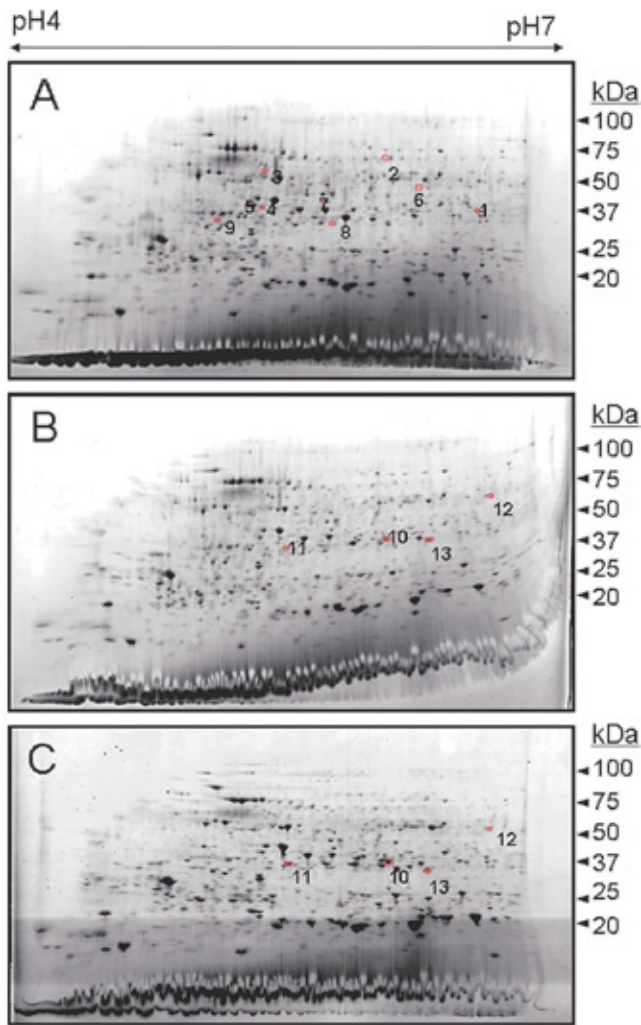


図3 品種・熟度の違いによるタンパク質の発現比較

A: ベニホパリ成熟果、B: ベニホパリ未成熟果、C: 宝交早生成  
赤く囲んだスポットをLTQ Orbitrap XLで分析した。  
番号は試料番号を示している。

ど) が最も多く、次いでエネルギー代謝、アミノ酸・有機酸合成タンパク質が多かった。

一方、ヘタ離れ抑制候補タンパク質群では、リグニン合成に関与する酵素タンパク質 O-methyl transferase (OMT) (gi:6760443) や細胞壁構成成分であるセルロースの合成に関わる酵素タンパク質 Reversibly Glycosylated Polypeptide3 (RGP3), Annexin2 (ANN2) (gi:147778328, 147856520) といった、個々の細胞をより強固にするようなタンパク質が含まれていた (図 5A)。また、抑制タンパク質群に植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) の情報伝達因子 Serine/threonine-protein kinase 10 (SAPK10) (gi:115454105) が含まれていた。

組織内局在性は、どちらのタンパク質群も葉緑体を含む色素体に存在するものが最も多く、次いで細胞膜やアポプラスト、細胞壁といった細胞外周辺に局在するタンパク質が多かった (図 5B)。色素体は独自のゲノムを有し、自立的にタンパク質合成を行い、器官によって様々なオルガネラに分化・分裂する。果実では、成熟に伴い色素体からクロモプラスト (有色体) に分化する。成熟に伴い果実が色づいていく過程で、フラボノイド合成関連タンパク質や転写関連因子などの発現量が増加したため、頻度が高くなったと考えられる。また、ヘタ離れ促進候補タンパク質ではミトコンドリアや細胞骨格に分類されるタンパク質が多く含まれていた。ミトコンドリアは主に ATP 産生 (呼吸) や有機酸・アミノ酸合成に機能するオルガネラである。これらタンパク質群における生体機能分布ではエネルギー代謝関連や有機酸・アミノ酸合成が多く含まれており、この結果を反映しているものと考えられた。

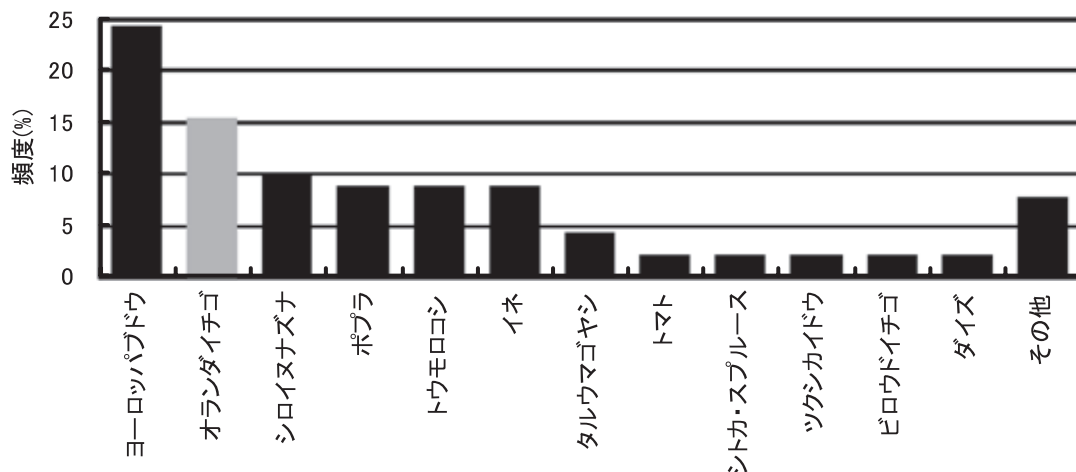


図4 イチゴ果実から同定したタンパク質の生物種分布

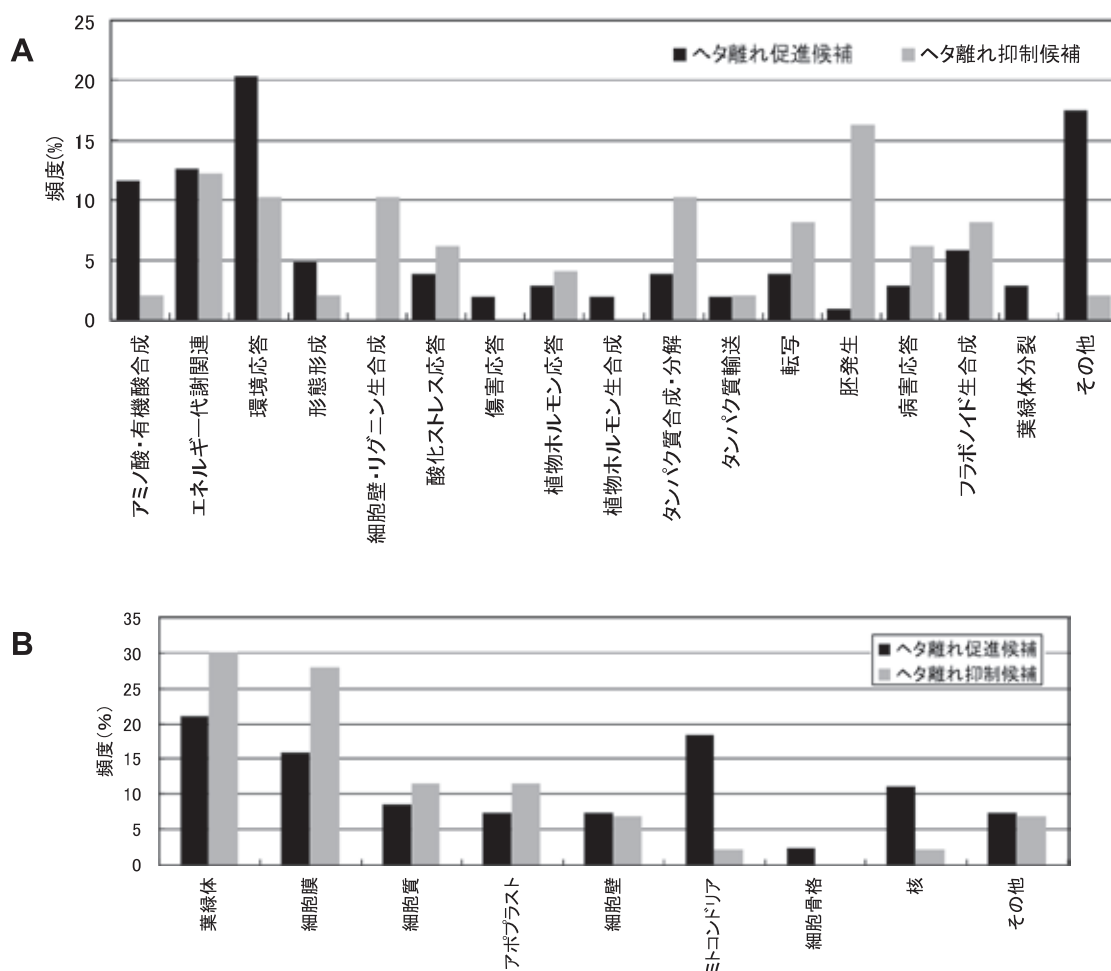


図5 同定タンパク質のシロイヌナズナ相同遺伝子における  
生体内機能および細胞内局在性分類  
A: 生体内機能、B: 細胞内局在性

## 考 察

今回の質量分析で同定された登録情報があるタンパク質の植物種は、ヨーロッパブドウ (*Vitis vinifera* L.) が最も多く、次いでオランダイチゴ (*Fragaria × ananassa*)、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) の順であった。ブドウが最も多く検出された原因として以下が考えられる。ブドウの遺伝子数は30,434個と、同程度のゲノムサイズを持つ植物と比較して少ない。しかし、ワインの香りや風味となるようなテルペンやタンニンなどの合成酵素遺伝子数は他の植物の2倍以上である<sup>5)</sup>。イチゴもポリフェノールを豊富に含む果実であるため、種々の合成酵素遺伝子群が存在していることが予想され、それらがブドウに含まれている酵素遺伝子群と一致したため、ブドウ由来タンパク質との一致数が増加したと考えている。

質量分析の結果から、ヘタ離れ促進候補タンパク質として、エチレン合成酵素であるSAM合成酵素が同定された。SAM合成酵素はメチオニンとATPを基質とし、ポリア

ミンやエチレン合成の中間体であるS-アデノシルメチオニンを合成する酵素である。シロイヌナズナを用いた研究から、このSAM合成酵素の活性を阻害するとエチレンの生成量が減少することが報告されており、エチレン合成には重要なタンパク質であるとされている<sup>6)</sup>。従って、SAM合成酵素タンパク質の蓄積量が‘宝交早生’や‘ベニヒバリ’未熟果より多かった‘ベニヒバリ’成熟果では、エチレン生成量が増加していることが推定された。

エチレンは、果実等の成熟・老化を促進する作用を持つ植物ホルモンであり、果実の成熟に伴ってエチレン生成量は増加することが知られている。しかし、イチゴ果実は果実成熟時に呼吸量やエチレン生成量の増大が起こらない(追熟の起こらない)ノンクライマクテリック型果実であり、成熟にエチレンを必要としないと考えられている。また、エチレン生成量自体もリング等のクライマクテリック型果実の1/20～1/2000程度と非常に少なく、エチレン処理やエチレン感受阻害剤1-MCP処理も果実の貯蔵性には影響しないことが報告されている<sup>7-8)</sup>。一方で、イチゴ果

実へのエチレン処理によりエチレン受容体遺伝子の発現量が増加する事が報告され、果実成熟に伴う代謝（反応）にエチレンが関与していることが推測されている<sup>9)</sup>。また、イチゴにおいても果実の軟化を促進する働きを持つポリガラクトツロナーゼはエチレンによりその遺伝子発現が亢進され、反対に軟化を抑制するペクチンエステラーゼはエチレンにより遺伝子発現が抑制されることが報告されている<sup>10-11)</sup>。

以上のことから、ヘタ離れ性が高いイチゴ果実では、エチレンの生成量が増大し、その結果、ヘタ部組織のみの軟化が促進され、ヘタ離れに繋がることが推測された。今後は、エチレンまたはエチレン阻害剤をイチゴ果実に処理し、ヘタ離れに及ぼす影響を調査する必要がある。

一方で、ヘタ離れを抑制するタンパク質群の候補としてリグニン生成関連酵素である OMT や、細胞壁の構築に関与するタンパク質である RGP3、ANN2 が同定された。OMT 遺伝子欠損トウモロコシ変異株 *brown-midrib3* では、リグニン含量が減少していることが報告されている<sup>12)</sup>。また、RGP タンパク質ファミリーは、UDP-グルコースのグリコシド結合を触媒する事により、セルロースを合成すると推測されている<sup>13-14)</sup>。シロイヌナズナでは少なくとも7種の Annexin が、細胞の周辺に局在し、カルシウムやリン脂質と結合することで様々な機能を示すことが推測されている。Annexin の機能の一つにペクチンやセルロースと言った多糖類を細胞膜や壁へ輸送することが報告されている<sup>15)</sup>。ANN2 遺伝子は花や根で発現が見られる Annexin であり、イチゴにおいても細胞壁構成成分の輸送に関与している可能性がある。これらのタンパク質が増大することによって、細胞個々の硬さや細胞同士の接着力が増大し、ヘタ離れが起こり難くなっていることが推測される。今後は、ヘタ部組織の硬さや細胞壁構成成分の解析を行う必要があると考える。

‘ベニヒバリ’は‘宝交早生’より果実が硬いことが報告されており<sup>1)</sup>、‘ベニヒバリ’ではエチレンによってヘタ部の軟化が起きていると言った仮説は、矛盾しているように考えられる。しかし、この果実の硬さは果実の赤道部あるいは果実の表面付近のみを測定した結果であり、ヘタ部の測定は行っていないため、ヘタ部組織の物理的強度を測定する必要がある。

また、今回の調査では、ABA の情報伝達因子である SAPK10 が、ヘタ離れ抑制候補タンパク質として同定された。SAPK10 は、ABA に応じて気孔を閉じ組織の水分低下を防ぐ役割を担うタンパク質である<sup>17)</sup>。SAPK10 の蓄積量が少ない‘ベニヒバリ’成熟果では気孔が閉じにくいいため、水分低下が起こりやすいと考えられる。カキでは収穫後の果実における水分低下がエチレン合成のトリガーとなることと、最も早くエチレン合成が起こる部位がヘタ部であることが報告されている<sup>16)</sup>。イチゴ果実においてもカキと同様の機構があるとするならば、‘ベニヒバリ’成熟果では、気孔が閉じず水分低下を起こし、その水分低下をトリガーとしてヘタ部よりエチレン合成が開始され、ヘタ部周辺の組織が軟化し、最終的にヘタ離れが起こることも推測される。

## 参考文献

- 1) Darrow G.M. 川里 宏 訳: *The Strawberry*, 川里氏の個人出版 (The New England Institute for Medical Research: 原著), (2009).
- 2) 宮崎正則, 佐藤 宏, 奥 正和, 後藤隆子: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, **21**, 1-9 (1996).
- 3) 高橋 徹, 森 大蔵, 奥 正和, 後藤隆子: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, **24**, 9-17 (2002).
- 4) Zheng Q, Song J, Doncaster K, Rowland E, Byers DM: *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1663-73 (2007).
- 5) Olivier J. *et al*: *Nature*, **449**, 463-467 (2007)
- 6) Christian L., Gerhard S., Gunther B., Jorg D.: *J. Biol. Chem.*, **281**, 4285-4291 (2006)
- 7) Perkins-Veazie P.M., Huber D.J., Brecht J.K.: *Ann. Appl. Biol.*, **128**, 105-116 (1996)
- 8) 立木美保: 果樹研究所研究報告, **6**, 11-22 (2003)
- 9) Trainotti L., Pavanello A., Casadoro G.: *J. Experi. Botany*, **56**, 2037-2046 (2005)
- 10) Quesada M. A., Blanco-Portales R., Posé S., García-Gago J. A., Jiménez-Bermúdez S., Muñoz-Serrano A., Caballero J. L., Pliego-Alfaro F., Mercado J. A., Muñoz-Blanco J.: *Plant Physiol.*, **150**, 1022-1032 (2009)
- 11) Castillejo C., de la Fuente J. I., Iannetta P., Botella M. A., Valpuesta V.: *J Experi. Botany*, **55**, 909-918 (2004)
- 12) Vignols F., Rigau J., Torres M. A., Capellades M., Puigdomènech P.: *Plant Cell*, **7**, 407-416 (1995)
- 13) Dhugga K. S., Ulvskov P., Gallagher S. R., Ray P. M.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 21977-21984 (1992)
- 14) Dhugga K. S., Tiwari S. C., Ray P. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 7679-7684 (1997)
- 15) Clark G. B., Sessions A., Eastburn D. J., Roux S. J.: *Plant Physiol.*, **126**, 1072-1084 (2001)
- 16) 稲葉昭次: 岡山大学農学部学術報告, **96**, 71-77 (2006)
- 17) Yoshida R., Umezawa T., Mizoguchi T., Takahashi S., Takahashi F., Shinozaki K.: *J. Biol. Chem.* **281**, 5310-5318 (2006)