

プロテオーム解析によるイチゴヘタ離れ因子の探索 (2)

阿部 竜也, 高橋 徹

Proteomic Analysis of Capping Factor in Strawberry II.

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. To elucidate the mechanism of capping, the proteins involved in remove of the calyx were explored by proteome analysis.

One-hundred and eleven proteins were considered as ‘the capping promoting proteins’ that was expected to promote detachment of the calyx. One-hundred and forty-one individual proteins were considered as ‘the capping suppressing proteins’ that were expected to suppress detachment of the calyx. Many of these proteins were involved in cell wall biosynthesis and modification proteins or plant hormone-related proteins. Co-expression genes with ‘the capping promoting proteins’ genes were included cellulose biosynthesis genes and ethylene-related genes. Whereas, lignin and pectin biosynthesis related genes were found to be co-expressed with ‘the capping suppressing proteins’. These results suggest that ethylene and cell wall properties can be regarded as the capping factor in strawberries.

Key words: Strawberry, Capping, Ethylene, Cell Wall, Proteome

当研究所で交配育種された加工用イチゴ品種‘ベニヒバリ’は、ヘタ離れ性が高いという特性を持っている。ヘタ離れ性の高さは、収穫作業の省力化・軽減化、加工品への異物混入を阻止できることから、加工用品種において重要な形質である。この形質は、遺伝学的解析から遺伝率が高く、ヘタ離れを制御する遺伝子の存在が示唆されているが、明らかになっていない¹⁾。2009年にアメリカ農務省 国立食糧農業研究所 (NIFA) が提唱した、RosBREED (<http://www.rosbreed.org/>) と呼ばれる、バラ科果実・野菜の有用形質を対象としたDNAマーカー育種の基盤整備プロジェクトでは、ヘタ離れ形質が農業的に重要な形質として位置づけられ、解析対象の1つとされている。イチゴの染色体は8組あり、形質の遺伝や発現要因が複雑である。そこで、遺伝子情報に基づき合成され、機能を担うタンパク質に着目し、ヘタ離れに関与するタンパク質の特定に取り組んでいる。

ヘタ離れが起こる果実果梗部のタンパク質を抽出し、pH4-7の間に等電点を持つ酸性側タンパク質と、pH6-11の間に等電点を持つ塩基性側タンパク質に分けて、ヘタ離れ性が異なる品種間で比較した。酸性側タンパク質を調査した結果、ヘタ離れを促進する作用が期待されるもの（ヘタ離れ促進タンパク質候補）が50種、ヘタ離れを抑制する作用が期待されるもの（ヘタ離れ抑制タンパク質候補）が34種見出されている。これらの生体内機能を推定、分類したところ、ヘタ離れ促進タンパク質候補群には、エチ

レン生合成酵素であるS-アデノシルメチオニン (SAMS) 生合成酵素やエチレンにより誘導されるタンパク質群が含まれていた。一方、ヘタ離れ抑制タンパク質候補群には、リグニン生合成に関与するタンパク質群が含まれていた²⁾。

本稿では、塩基性側タンパク質の解析結果、ならびにプロテオーム解析の総括を報告する。

材料および方法

1. 材料

イチゴ (*Fragaria × ananassa*) は‘ベニヒバリ’および‘ベニヒバリ’の雌親品種である‘宝交早生’の2品種を供試した。当所農場にて露地栽培し、果実全体が赤く着色したものを成熟果実、それ以外を未成熟果実とした。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、ヘタ離れ部位を含む果梗部と果実部分に分け、液体窒素で急速冷凍した後、-80℃で保存した。

2. タンパク質の抽出

凍結試料を液体窒素中で粉末状に粉碎した後、フェノール抽出法によりタンパク質を抽出し、酢酸アンモニウム含有メタノール沈殿法で精製した²⁾。2D-Quant Kit (GE ヘ

ルスケア・ジャパン(株)を用いて、抽出タンパク質の濃度を測定した。

3. タンパク質の発現解析

Multiphor II 電気泳動装置 (GE ヘルスケア・ジャパン(株))を用いた二次元電気泳動により、抽出タンパク質の固有等電点・分子量毎に分画した。等電点電気泳動用ゲルにはブレイキャストゲルである Immobiline DryStrip IPG ゲル (アクリルアミドゲル濃度 4% T/3% C, GE ヘルスケア・ジャパン(株))より、酸性側には pH4-7、塩基性側には pH6-11 の pH 勾配ゲルを使用した。等電点電気泳動終了後の IPG ゲルを、1% ジチオトレイトール (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 トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸 (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) で平衡化した後、ExcelGel SDS gradient (アクリルアミド濃度 8-18% T/3% C, GE ヘルスケア・ジャパン(株))上に載せ、二次元目の電気泳動を行った。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℃下で行った。

二次元展開した後のゲルを GT-X900 (セイコーエプソン(株))を用いてスキャンし、画像データを取得した。ImageMaster 2D Platinum (GE ヘルスケア・ジャパン(株))を用いてタンパク質スポットの検出・比較を行った。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、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、塩基性側タンパク質の解析では、試料タンパク質の分離度を向上させるため、還元剤として DTT と併せて Destreak reagents (GE ヘルスケア・ジャパン(株))を試料溶液 1ml に対して 12 µl 添加した。

4. タンパク質の質量分析

品種特異的な発現がみられたタンパク質をゲルとともに切り出し、トリプシンによる泳動ゲル内消化法 (in gel digestion) によって断片化した後、LC-MS/MS (Thermo Scientific:LTQ Orbitrap XL)を用いて質量分析を行った。得られた質量分析データを基に Mascot search によりタンパク質データベース情報検索を行った²⁾。

5. タンパク質の機能推定

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) によりシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の相同タンパク質を検索し、次いで GO (Gene Ontology) データベースにより生体内機能を推定した¹⁾。その中で植物ホルモンおよび細胞壁生合成・修飾に関連するものを対象として、共発現している遺伝子を絞り込むと共に、推定した機能の妥当

性を評価した。尚、共発現遺伝子の検索は、シロイヌナズナのマイクロアレイデータを利用したデータベースである ATTED-II (<http://atted.jp/>)を用いた。

本文の遺伝子およびタンパク質の記述は、シロイヌナズナの記述方法に準拠し、以下の例に習い記載した (参考: <http://www.arabidopsis.org/portals/nomenclature/guidelines.jsp>)。ただし、表中ではデータベース上に記載された通りの形で表記した。

野生型遺伝子; 正式名称: *Cellulose synthase A*

略式名称: *CESA*

変異型遺伝子; 正式名称: *cellulose synthase A*

略式名称: *cesA*

タンパク質 ; 正式名称: CELLULOSE SYNTHASE A

略式名称: *CESA*

結果および考察

1. タンパク質の発現解析と機能推定

果梗部から抽出したタンパク質を二次元電気泳動により分画し、ヘタ離れ性が異なる品種間で比較した。酸性側タンパク質と同じ条件で塩基性側タンパク質の二次元電気泳動を行ったところ、ほとんどのタンパク質スポットでストリーキングと呼ばれる水平方向のすじを生じ、分離できなかった。原因として、添加した還元剤の還元力が塩基性条件下で弱まることで、システイン残基の還元が不十分になり、タンパク質間の非特異的な凝集や緩衝液中の尿素との反応が起これ、電気泳動を阻害したことが考えられた。そこで、試料タンパク質の添加量や泳動条件の変更、還元剤として DTT と Destreak reagents の併用を試みたところ、還元剤併用により分離可能となった。還元剤を併用し解析した結果、のべ 685 個のタンパク質スポットが検出できた (図 1)。酸性側タンパク質 (スポット数 1,373 個) と比較して、塩基性側タンパク質のスポット検出数は減少していたが、他の分離度改善法と合わせても効果が得られなかったこと、分離したスポット自体は明瞭であったことから、解析を進めた。今後、より詳細な塩基性側タンパク質の解析を進めるには、Radical-Free High Reducing Method (RFHR 法) 二次元電気泳動のようなタンパク質の等電点に依存しない泳動法が適切であると考えられた。

検出スポットの比較より、‘ベニヒバリ’成熟果で特異的に発現しているスポットが 6 個、特異的に発現が抑えられているスポットが 5 個見出された。これらを LC-MS/MS で分析したところ、前者からは 75 個、後者からは 138 個のタンパク質が見出された。

選定した塩基性側タンパク質と酸性側タンパク質の調査結果を合わせて、各タンパク質の機能推定を行った。解析対象は‘ベニヒバリ’成熟果で特異的に発現しており、ヘタ離れを促進すると推定されるもの (ヘタ離れ促進タンパク質候補、以後、促進タンパク質) 111 個、‘ベニヒバリ’成熟果で特異的に発現が抑制されており、ヘタ離れを抑制すると推定されるもの (ヘタ離れ抑制タンパク質候補、以

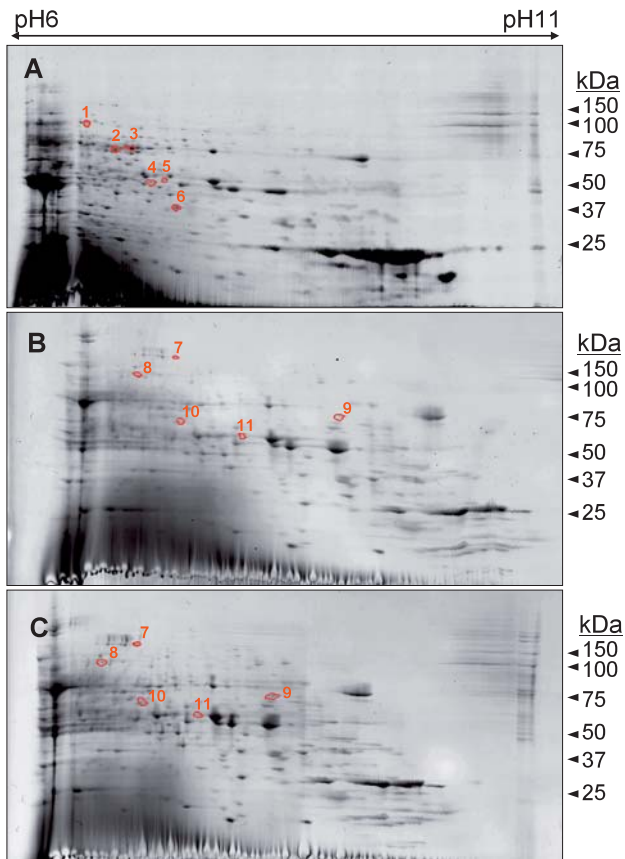


図1 品種・熟度の違いによるタンパク質スポットの発現比較

A: ベニヒバリ成熟果 (ヘタ離れ性あり)

B: ベニヒバリ未成熟果 (ヘタ離れ性なし)

C: 宝交早生成熟果 (ヘタ離れ性なし)

* 赤色のスポットはヘタ離れ性あり / なしで差があったもの。これらを LC-MS/MS で分析した。

* B と C は同じ位置に存在するスポットを示しており、より明瞭なスポットを LC-MS/MS 分析試料とした。

後、抑制タンパク質) 141 個である。これらの生体内機能について、GO データベースを基に推定・分類したところ、促進・抑制タンパク質共に環境応答タンパク質が多く、次いで病傷害応答タンパク質、植物ホルモン関連タンパク質の順で多かった (図 2)。

環境応答タンパク質ではカドミウムイオン応答を担うものが多かった。イチゴは pH6 付近の酸性土壌を好むため、栽培用土を pH6.2-6.4 に調整する。これにより、土壌中のアルミニウムやカドミウムがイオン化・溶出し、植物に吸収される可能性が考えられた。しかし、本研究で使用している栽培土壌の主体はバーミキュライト (ニッタイ株) であり、カドミウムは含まれていないため、供試したイチゴがカドミウムを多量に吸収した可能性は低い。GO データベースにおけるカドミウムイオン応答タンパク質の定義は、「細胞または組織をカドミウム処理した時に遺伝子発現や酵素生成量に変化等が見られた遺伝子またはタンパク質」であり、必ずしもカドミウム代謝に限定されるものではない。従って、カドミウム以外の金属イオンあるいは他の物質に応答して、発現挙動が変化したものと推測される。

植物ホルモン関連では、促進タンパク質にはエチレンやオーキシニンに関わるものが、抑制タンパク質には傷害により誘導される植物ホルモンの一つジャスモン酸に関わるものが多かった (表 1)。

細胞壁合成・修飾関連では、促進タンパク質にはセルロース・ヘミセルロース合成に関わるタンパク質が多く、抑制タンパク質にはペクチンやリグニンの生合成に関わるものが多かった (表 2)。

‘ベニヒバリ’の成熟果実と未成熟果実で発現が一致していたタンパク質スポットは、酸性側・塩基性側合わせて 1,501 個中 1,090 個であり、一致率は 72.7% であった。残り 411 個のタンパク質スポットが、果実の成熟に伴い発現

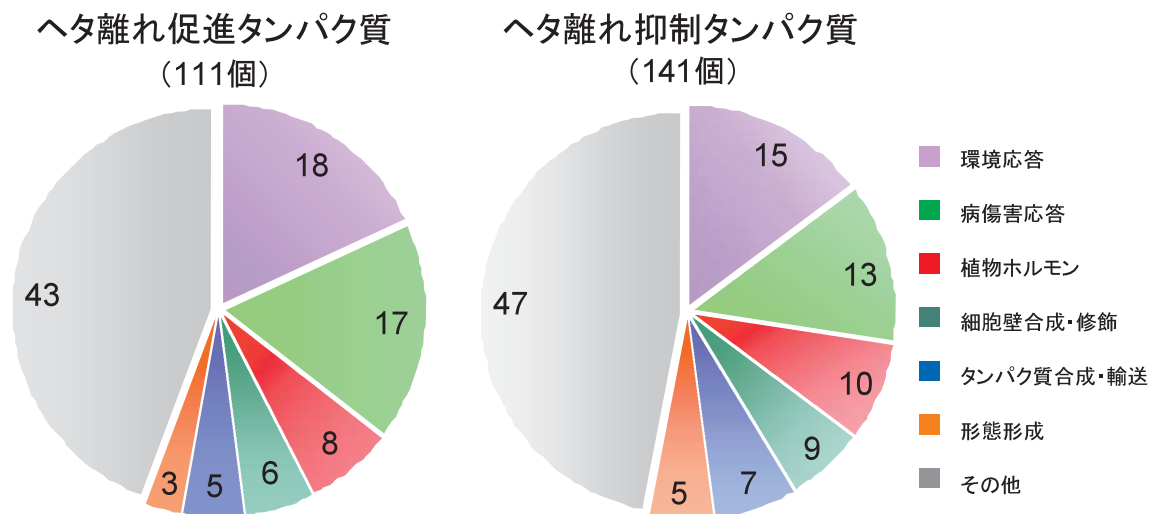


図2 発現変化がみられたタンパク質の推定された機能分類

グラフ内の数値は比率 (%)

表 1 ヘタ離れに関与すると考えられる植物ホルモン関連のタンパク質

試料#	タンパク質名	登録ID	分子量	NP	Coverage (%)	相同遺伝子	Arabidopsis gene ID	関連植物ホルモン
ヘタ離れ促進タンパク質候補	1 chalcon synthase [Fragaria x ananassa]	gi 13183377 (+6)	43 kDa	15	22	TRANSPARENT TESTA 4	831241	オーキシシン ジャスモン酸
	2 pyruvate decarboxylase [Fragaria x ananassa]	gi 10121330	65 kDa	9	15	pyruvate decarboxylase, putative	829444	エチレン
	3 S'-adenosylmethionine synthetase [Oryza sativa]	gi 100801530 (+41)	43 kDa	4	11	SAM1 (S'-ADENOSYLMETHIONINE SYNTHETASE 1); methionine adenosyltransferase	839501	エチレン
	4 anthocyanidin synthase [Fragaria x ananassa]	gi 51872681 (+1)	43 kDa	3	9	Leucoanthocyanidin dioxygenase	828387	ジャスモン酸
	5 hypothetical protein [Vitis vinifera]	gi 147834295 (+1)	36 kDa	2	4	Gibberellin receptor GID1, putative	824031	ジベレリン
	6 flag-tagged protein kinase domain of putative mitogen-activated protein kinase kinase kinase [synthetic construct]	gi 116643246 (+3)	51 kDa	2	5	VIK (VH1-INTERACTING KINASE); ATP binding / protein kinase / protein serine/threonine/tyrosine kinase	837960	オーキシシン ブラスノステロイド
	7 predicted protein [Populus trichocarpa]	gi 222855026 gb EEE92573.1	51 kDa	2	5	AGD6; ARF GTPase activator/ DNA binding / zinc ion binding	824538	オーキシシン
	8 Rack [Phaseolus vulgaris]	gi 212292267 (+4)	36 kDa	3	3	RACK1C AT RACK1C AT (RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1 C); nucleotide binding	821338	ABA
	9 Aldo/keto reductase [Medicago truncatula]	gi 124360837 (+3)	20 kDa	3	23	AT1G60730 aldo/keto reductase family protein	842367	オーキシシン
ヘタ離れ抑制タンパク質候補	1 rhamnose synthase [Gossypium hirsutum]	gi 211906526	75 kDa	16	17	RHM1 RHM1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 1); UDP-L-rhamnose synthase/ UDP-glucose 4,6-dehydratase/ catalytic	844193	オーキシシン
	2 predicted protein [Populus trichocarpa]	gi 222873884 gb EEF11015.1	76 kDa	13	15	RHM1 RHM1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 1); UDP-L-rhamnose synthase/ UDP-glucose 4,6-dehydratase/ catalytic	844193	オーキシシン
	3 hypothetical protein [Vitis vinifera]	gi 147866537 (+2)	49 kDa	11	15	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3); acetyl-CoA C:acyltransferase	817876	ジャスモン酸
	4 3-ketoacyl-CoA thiolase B; acetyl-CoA C:acyltransferase [Mangifera indica]	gi 1129145	45 kDa	9	15	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3); acetyl-CoA C:acyltransferase	817876	ジャスモン酸
	5 unknown [Picea sitchensis]	gi 148907285	48 kDa	8	11	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3); acetyl-CoA C:acyltransferase	817876	ジャスモン酸
	6 Transaminase mtne, putative [Ricinus communis]	gi 223538651 gb EEF40252.1	50 kDa	7	13	AGD2 (ABERRANT GROWTH AND DEATH 2); L,L-diaminopimelate aminotransferase/ transaminase	829510	サリチル酸
	7 ACT1 [Actinidia deliciosa]	gi 149938964 (+37)	42 kDa	5	9	ACT7 (ACTIN 7); structural constituent of cytoskeleton	830841	オーキシシン
	8 3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal precursor [Zea mays]	gi 195634961 (+1)	48 kDa	5	15	PKT3 (PEROXISOMAL 3-KETOACYL-COA THIOLASE 3); acetyl-CoA C:acyltransferase	817876	ジャスモン酸
	9 chalcone synthase [Fragaria x ananassa]	gi 62766610 (+2)	43 kDa	2	6	CHS (CHALCONE SYNTHASE)	831241	オーキシシン ジャスモン酸
	10 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]	gi 147789426 emb CAN66609.1	45 kDa	2	5	RNA recognition motif (RRM)-containing protein	820730	エチレン
	11 predicted protein [Populus trichocarpa]	gi 222849460 gb EEE87007.1	41 kDa	9	12	AGB1 (GTP BINDING PROTEIN BETA 1); GTPase/ nucleotide binding / protein binding	829597	ジャスモン酸
	12 unknown [Medicago truncatula]	gi 217072090	39 kDa	4	14	OST1 serine/threonine protein kinase SRK2E	829541	ABA
	13 GDP-mannose pyrophosphorylase [Solanum lycopersicum]	gi 113715733 (+23)	40 kDa	2	6	CYT1 mannose-1-phosphate guanylyltransferase	818562	ジャスモン酸
	14 Os03g0610900 [Oryza sativa (japonica cultivar group)]	gi 115454105 (+5)	41 kDa	2	7	OST1 serine/threonine protein kinase SRK2E	829541	ABA

* Genbank 登録 ID の括弧内の数字は、見出された生物種の数、すなわち同じアミノ酸配列を持った相同タンパク質の数を示している。

* NP (Number of Peptide) は、帰属されたペプチド断片の本数を示している。

* Coverage は、質量分析で得られたペプチド断片のアミノ酸配列のうち、帰属タンパク質のアミノ酸配列と一致したもの割合

* 相同遺伝子は、BLAST 検索の結果示された、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 遺伝子の中で、最も上位すなわち相関性が高いとされたものを示した。

* Arabidopsis gene ID は、GO データベースの対応 ID を示した。

表2 ヘタ離れに関与すると考えられる細胞壁関連のタンパク質

試料#	タンパク質名	登録ID	分子量	NP	Coverage (%)	相同遺伝子	Arabidopsis gene ID	関連細胞壁成分
ヘタ離れ促進タンパク質候補	RecName: Full=UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase; AltName: Full=UDP-glucose pyrophosphorylase; Short=UGPase; gi 3107931 dbj BAA25917.1 UDP-glucose pyrophosphorylase [Pyrus pyrifolia]	gi 6136112	52 kDa	2	7	AT5G17310 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase, putative / UDP-glucose pyrophosphorylase, putative / UGPase, putative	831596	ヘミセルロース合成
	predicted protein [Populus trichocarpa], gi 222841910 gb EEE79457.1 predicted protein [Populus trichocarpa]	gi 224074891	39 kDa	6	13	UGE1 UGE1 (UDP-D-glucose/UDP-D-galactose 4-epimerase 1); UDP-glucose 4-epimerase/ protein dimerization	837834	ヘミセルロース合成
	RecName: Full=Probable mannitol dehydrogenase; AltName: Full=NAD-dependent mannitol dehydrogenase; gi 4097522 gb AAD10327.1 cinnamyl alcohol dehydrogenase [Fragaria x ananassa]	gi 10720093	39 kDa	4	6	ELI3-2 cinnamyl alcohol dehydrogenase 8	829955	リグニン合成
	UDP-D-glucuronate carboxy-lyase [Eucalyptus grandis]	gi 192338748 (+1)	39 kDa	24	25	UXS3 UXS3 (UDP-GLUCURONIC ACID DECARBOXYLASE 3); UDP-glucuronate decarboxylase/ catalytic	836047	セルロース合成
	unknown [Populus trichocarpa]	gi 118488420 (+1)	26 kDa	7	20	TUF (VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT E1); proton-transporting ATPase, rotational mechanism	826716	細胞壁合成
	polygalacturonase-like protein [Fragaria x ananassa]	gi 30692538	52 kDa	2	7	AT3G61490 glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	825322	ペクチン分解
ヘタ離れ抑制タンパク質候補	rhamnose synthase [Gossypium hirsutum]	gi 211906526	75 kDa	16	17	RHM1 RHM1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 1); UDP-L-rhamnose synthase/ UDP-glucose 4,6-dehydratase/ catalytic	844193	ペクチン合成
	predicted protein [Populus trichocarpa], gi 222873884 gb EEF11015.1 predicted protein [Populus trichocarpa]	gi 224119002	76 kDa	13	15	RHM1 RHM1 (RHAMNOSE BIOSYNTHESIS 1); UDP-L-rhamnose synthase/ UDP-glucose 4,6-dehydratase/ catalytic	844193	ペクチン合成
	polygalacturonase [Fragaria x ananassa]	gi 30908915 (+1)	43 kDa	9	24	polygalacturonase 3 (PGA3) / pectinase	819973	ペクチン分解
	RecName: Full=S-adenosylmethionine synthase 3; Short=AdoMet synthase 3; AltName: Full=Methionine adenosyltransferase 3; Short=MAT 3; gi 429108 emb CAA80867.1 S-adenosyl-L-methionine synthetase [Solanum lycopersicum]	gi 1170939 (+5)	43 kDa	3	10	MTO3 (METHIONINE OVER-ACCUMULATOR 3); methionine adenosyltransferase	821003	リグニン合成
	ACT1 [Actinidia deliciosa]	gi 149938964 (+37)	42 kDa	5	9	ACT7 (ACTIN 7); structural constituent of cytoskeleton	830841	細胞壁合成
	UDP-D-glucuronate carboxy-lyase [Pisum sativum]	gi 13591616 (+14)	39 kDa	8	17	UXS5; UDP-glucuronate decarboxylase/ catalytic	823794	ヘミセルロース合成
	unknown [Picea sitchensis]	gi 116779321 (+10)	41 kDa	3	5	RGP3 reversibly glycosylated polypeptide 3	820039	セルロース合成
	O-methyltransferase [Fragaria x ananassa]	gi 6760443	40 kDa	8	29	ATOMT1 (O-METHYLTRANSFERASE 1); caffeate O-methyltransferase/ myricetin 3'-O-methyltransferase/ quercetin 3'-O-methyltransferase	835504	リグニン合成
	hypothetical protein [Vitis vinifera]	gi 147842163 (+1)	36 kDa	3	10	TOPP1 (Type one serine/threonine protein phosphatase 1); protein serine/threonine phosphatase	817489	ペクチン合成
	hypothetical protein [Vitis vinifera]	gi 147778328 (+2)	42 kDa	2	5	RGP3 reversibly glycosylated polypeptide 3	820039	セルロース合成
	K ⁺ channel protein	gi 1063415 (+3)	36 kDa	3	5	KAB1 (POTASSIUM CHANNEL BETA SUBUNIT); oxidoreductase/ potassium channel	839450	ヘミセルロース合成
	putative alcohol dehydrogenase [Solanum lycopersicum]	gi 148888529	36 kDa	2	5	AT5G19440 cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative (CAD)	832064	リグニン合成

*項目の説明は表1と同じ

*細胞壁合成とは、セルロースおよびペクチン生合成全体に関わる遺伝子と定義した。

量が増減するタンパク質であることが推察された。DNA マイクロアレイ解析から、イチゴ果托の発達に伴い一次代謝関連、細胞壁関連、色素合成関連の遺伝子発現が変動することが報告されている³⁾。なかでも、*Chalcone synthase* 遺伝子や *Anthocyanidin synthase* 遺伝子といった色素合成酵素遺伝子、*Pectate lyase* 遺伝子や *Expansin* 遺伝子といった細胞壁の強度を低下させる遺伝子の発現量は果托の発達に伴い 10 倍以上増加することが報告されており、411 個のスポットには、これらのタンパク質が含まれている可能性が高いと考えられた。

2. ATTED-II を用いた共発現遺伝子の探索

2-1. 植物ホルモン関連遺伝子

表 1 に示した植物ホルモン関連タンパク質、および表 2 に示した細胞壁生合成・修飾関連タンパク質をコードする遺伝子と、同様の発現挙動（共発現）を示す遺伝子を、ATTED-II データベースにより検索し、推定された機能の妥当性を評価した。植物ホルモン関連タンパク質と共発現していた遺伝子として、促進・抑制タンパク質共にオーキシン関連の遺伝子が多かった。また、促進タンパク質と共発現している遺伝子は、エチレン関連、アブシジン酸 (ABA) 関連遺伝子が多く、抑制タンパク質では、ジャスモン酸関連遺伝子が多かった (表 3)。これらの結果は、GO データベース情報に基づいて行った機能推定結果と矛盾せず、その妥当性の高さを支持するものであった。

オーキシンは植物全体の成長に深く関わる植物ホルモンで、果実に関しては肥大や種子の形成に関与しているため多く選定されたと考えられる。共発現していたオーキシン関連遺伝子のなかで、8 種は促進タンパク質と抑制タンパク質の両方に含まれた。エチレンや ABA は器官脱離に促進的に作用する植物ホルモンであり、共発現している遺伝子数がヘタ離れ促進タンパク質で増加していることは、ヘタ離れ性の高さとこれらの間に関連性があることが推測された。特に、エチレン関連遺伝子群の中には、エチレン生合成酵素の 1 つである ACC 酸化酵素の遺伝子が含まれて

おり、促進タンパク質候補である SAMS と連動し、‘ベニヒバリ’ のエチレン生成量は‘宝交早生’ より多いことを支持するものであった。ABA 関連遺伝子では、転写因子である *Abscisic acid insensitive 4 (ABI4)* 遺伝子が促進タンパク質と共発現していた。*ABI4* 遺伝子は種子の休眠促進、発芽抑制に関与する遺伝子であり⁴⁾、器官脱離や老化とは異なる代謝系の遺伝子であった。また、抑制タンパク質の一つ OPEN STOMATA 1 (OST1) はリン酸化タンパク質であり、その機能は ABA に応答した気孔開閉に関与するもので⁵⁾、促進タンパク質と共発現しているような ABA 関連遺伝子や器官脱離とは働きが異なるものであった。

抑制タンパク質と共発現している遺伝子では、ジャスモン酸関連遺伝子も多く含まれていた。ジャスモン酸は植物成長阻害物質として発見され、その後の研究により病傷害ストレスに応答して生成されることが知られている。さらに果実の成熟あるいは休眠打破など、エチレンやジベレリンと重複した機能を持つことが報告されている。ジャスモン酸処理は葉の離層形成を促進すると報告されているが、花や果実などの器官脱離への作用は不明であり⁶⁾、ヘタ離れへの関与も現時点では明確ではない。

2-2. 細胞壁関連遺伝子

植物ホルモン関連遺伝子と同様に、細胞壁の生合成や修飾に関連する遺伝子についても共発現する遺伝子を調べた。促進タンパク質と共発現していたものにはセルロース生合成に関わる遺伝子が多かった。抑制タンパク質と共発現していたものではリグニン・ペクチン生合成関連遺伝子が多かった (表 4)。

植物の細胞壁は、基本骨格であるセルロース、ヘミセルロースおよびペクチンなどの多糖類、フェニルプロパノイドであるリグニンに大別される (図 3A)。構造は鉄筋コンクリートに例えられ、鉄筋にあたるセルロースが、鉄筋を結びつける針金に相当するヘミセルロースによって結びつけられ、コンクリートに相当するペクチンやリグニンがそ

表 3 共発現していた遺伝子数 (植物ホルモン関連)

	オーキシン	エチレン	アブシジン酸	ブラシノステロイド	ジャスモン酸
ヘタ離れ促進	25	16	13	1	0
ヘタ離れ抑制	14	2	4	0	6

ATTED-II データベース内に登録されている植物ホルモン関連遺伝子 200 個から選定

表 4 共発現していた遺伝子数 (細胞壁合成・修飾関連)

	セルロース合成	ペクチン合成	ペクチン分解	リグニン合成	ヘミセルロース合成	細胞壁合成
ヘタ離れ促進	16	0	14	4	12	15
ヘタ離れ抑制	8	25	19	49	14	0

ATTED-II データベース内に登録されている全遺伝子 1388 個から選定

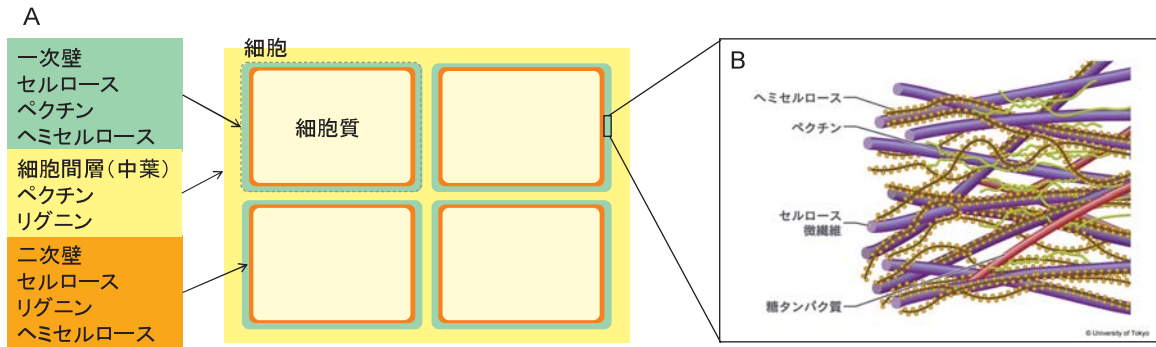


図3 細胞壁の構造

A: 細胞壁の種類と主成分を示している。

B: 一次壁の構造を示している (LS-EDI (<http://csls-db.c.u-tokyo.ac.jp/>) より転載)。

の間を埋めている (図3B)。

促進タンパク質では、セルロース生合成酵素遺伝子である *Cellulose synthase A* (CESA) や *Irregular xylem* (IRX) 遺伝子群が含まれており、これらの発現が低下するとセルロース量が低下し、特に二次壁の厚さが減少することが報告されている^{7,8)}。二次壁の厚さは細胞壁の伸展性に関わっている。水中のような重力の影響が少ない環境で生育させた植物では、セルロース量が低下し、細胞壁の伸展性が増加するが、遠心などにより通常より大きな重力を加えた場合は、セルラーゼ (β -1,4-グルカナーゼ) 活性が減少してセルロースの分解が抑制されるため、二次壁が厚くなり伸展性が減少する^{9, 10, 11)}。‘ベニヒバリ’ 果梗部では、セルロース生合成酵素遺伝子の発現増加に伴い、セルロースの合成量が増加し、厚い二次壁が形成されるため、伸展性が減少し、ヘタ離れが起こる可能性が考えられた。

抑制タンパク質では、リグニン生合成関連遺伝子としてフェニルプロパノイドやフラボノイドの代謝関連遺伝子が多く選定された。抑制タンパク質には CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE (CAD) や METHIONINE OVER-ACCUMULATOR 3 (MTO3), O-METHYLTRANSFERASE 1 (OMT1) といったリグニン生合成酵素タンパク質が含まれており、これらの遺伝子発現量が減少するとリグニン生合成量も減少することが報告されている^{12, 13, 14)}。ペクチン生合成関連では、ラムノース生合成酵素遺伝子である *Repressor of LRX 1* (ROL1) や糖転移酵素遺伝子である *Glucuronosyltransferase* (GUT1) が含まれていた。ROL1 や GUT1 は、ペクチンの1種であるラムノガラクトン II (RGII) の合成に関わる酵素である。なかでも GUT1 遺伝子は細胞接着への関与が大きく、離層が形成された組織においても、GUT1 遺伝子の発現が増加すると器官脱離が抑制されることや、*gut1* 欠損変異体では、細胞間接着が著しく弱まって茎や葉などを形成できないことが報告されている^{15, 16)}。抑制タンパク質候補である REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 3 (RGP3) タンパク質群は、Uridine diphosphate (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

ロースの基質である β -1,4-グルカン合成すると推測されているが、実験的な証拠は得られていない^{17, 18)}。また共発現している遺伝子群もペルオキシダーゼや病傷害応答遺伝子が多いことから、植物組織が食害等の損傷を受け、組織修復を行う際に形成する癒合組織の形成に関与していることが推測された。‘宝交早生’ 果梗部では、リグニン生合成酵素やペクチン生合成酵素遺伝子の発現が増加しているため、細胞接着の強度が増加しており、且つ ‘ベニヒバリ’ よりセルロースが少なく伸展性が高いためヘタ離れが起こらないことが推測された。

まとめ

ヘタ離れ性の異なるイチゴ果実を用いたプロテオーム解析により、ヘタ離れに関与するタンパク質を探索した。ヘタ離れを促進する作用が期待されるタンパク質が111個、ヘタ離れを抑制する作用が期待されるタンパク質が141個見出された。これらタンパク質の機能を推定し、植物ホルモンや細胞壁生合成・修飾に関連するものに注目して、共発現している遺伝子を選定した。結果、ヘタ離れへの関与が期待されたタンパク質の推定機能に近い働きを持つ共発現遺伝子が多数選定された。これは機能推定の妥当性を示すものといえる。タンパク質および遺伝子情報から、イチゴヘタ離れにはエチレンが関与すること、細胞壁の特性の違いがヘタ離れ性に影響することが推測された。現時点では ‘ベニヒバリ’ 果梗部の細胞壁は、‘宝交早生’ 果梗部の細胞壁よりセルロースに富んでいるため、伸展性が低く、引張りによる細胞間の開裂が起こりやすくヘタ離れすること、一方 ‘宝交早生’ は、‘ベニヒバリ’ より伸展性が相対的に高く、さらにペクチンやリグニンに富んでいるため、細胞間の接着強度が強くなり、細胞間の開裂が起こりにくくヘタ離れしにくいという仮説が立てられた (図4)。今後、エチレン生成量あるいは細胞壁構成成分を調査し、イチゴヘタ離れ機構との関係を検証する。

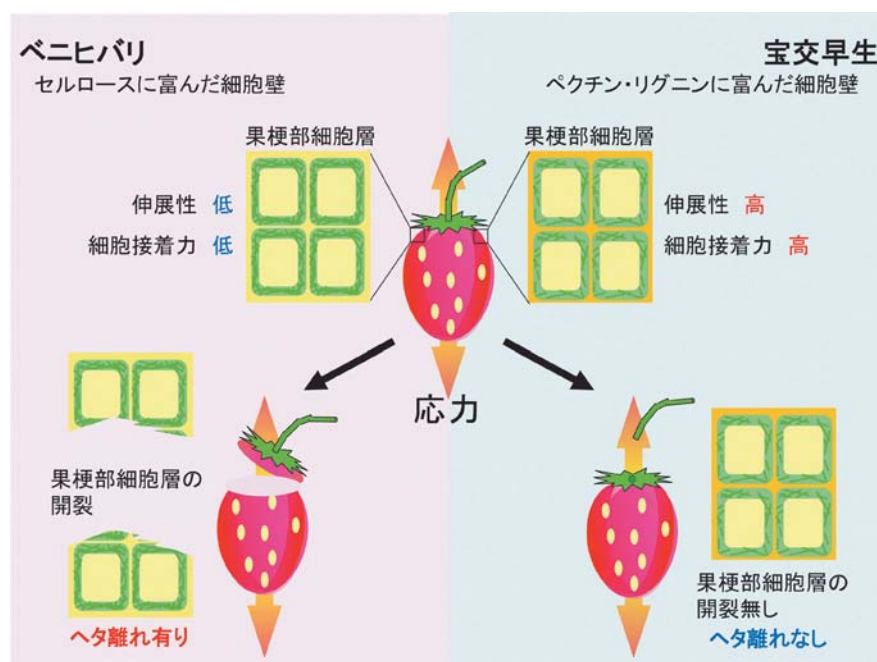


図4 細胞壁特性がヘタ離れ性に及ぼす影響についての仮説

文 献

- 1) 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).
- 2) 阿部竜也, 高橋 徹: 東洋食品工業短大・東洋食品研究所 研究報告書, **28**, 27-32 (2010).
- 3) Aharoni A. and O'Connell. A. P.: *J. Exp. Bot.*, **53**, 2073-2087 (2002).
- 4) Arenas-Huertero F., Arroyo A., Zhou L., Sheen J., León P.: *Genes Dev.*, **14**, 2085-2090 (2000).
- 5) Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J.R., Shinozaki K.: *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1473-1483 (2002).
- 6) 福田裕穂, 町田泰則, 神谷勇治, 柿本辰男: 新版 植物ホルモンのシグナル伝達. 秀潤社 (2004).
- 7) Taylor N. G., Howells R. M., Huttly A. K., Vickers K., Turner S. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **100**, 1450-1455 (2003).
- 8) Taylor N. G., Scheible W., Cutler S., Somerville C. R., Turner S. R.: *The Plant Cell*, **11**, 769-779 (1999).
- 9) 保尊隆享: 植物の化学調節, **34**, 226-235 (1999).
- 10) Hoson T. and Soga K.: *Int. Rev. Cytol.*, **229**, 209-244 (2003).
- 11) Nakabayashi I., Karahara I., Tamaoki D., Masuda K., Wakasugi T., Yamada K., Soga K., Hoson T., Kamisaka S.: *Ann. Bot.*, **97**, 1083-1090 (2006).
- 12) Kim S. J., Kim M. R., Bedgar D. R., Moinuddin S. G. A., Cardenas C. L., Davin L. B., Kang C.H., Lewis N. G.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101**, 1455-1460 (2004).
- 13) Shen B., Li C., Taraczynski M. C.: *Plant J.*, **29**, 371-380 (2002).
- 14) Dhugga K. S., Ulvskov P., Gallagher S. R., Ray P. M.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 21977-21984 (1991).
- 15) Iwai H., Masaoka N., Ishii T., Satoh S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **99**, 16319-16324 (2002).
- 16) Iwai H., Hokura A., Oishi M., Chida H., Ishii T., Sakai S., Satoh S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **103**, 16592-16599 (2006).
- 17) Vignols F., Rigau J., Torres M. A., Capellades M., Puigdomènech P.: *Plant Cell*, **7**, 407-416 (1995).
- 18) Dhugga K. S., Ulvskov P., Gallagher S. R., Ray P. M.: *J. Biol. Chem.*, **266**, 21977-21984 (1991).