HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イチゴ果実の品質評価に資するMALDI-TOF MSI技術の改良および応用に関する研究
Author(s)	藤木，卓巳
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16765号
Issue Date	2026-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16765
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99610
Type	doctoral thesis
File Information	FUJIKI_Takumi_summary.pdf，全文の要約

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

【課程博士】

博 士 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　藤　木　　卓　巳

学　位　論　文　題　名

イチゴ果実の品質評価に資する
MALDI-TOF MSI 技術の改良および応用に関する研究

オランダイチゴ（以後イチゴと略称；*Fragaria* × *ananassa* Duch.）は、国民の食生活並びに生産園芸振興の観点から重要な特定野菜の一つである。また、イチゴは農林水産省が掲げる輸出重点品目の一つである。国産イチゴ果実は、品質が海外産よりも高いことから、輸出拡大が期待されている。イチゴ果実の食味に影響を及ぼす要因として、糖および有機酸の含量および比率（糖酸比）が挙げられ、それらの果実内分布も食味に影響することが報告されている。しかし、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）や分光法などの従来の分析方法では、成分分布を詳細に評価することができない。そこで本研究では、組織切片に含まれる様々な化合物の空間分布を、数 μm の分解能で視覚化できるマトリクス支援レーザー脱離イオン化–飛行時間型質量分析イメージング（MALDI-TOF MSI）を用いて果実内成分分布を評価し、高品質果実の生産に資する技術開発に応用しようと考えた 。まず、従来の MALDI-TOF MSI が有する課題を解決し、成分分布の評価に適した方法の確立を目指した。次に、確立した方法（MALDI-TOF q-MSI）に基づき、イチゴ果実の成分分布における品種間差、果実成熟に伴う変動、並びに摘葉処理が成分分布に及ぼす影響を調査し、果実品質評価におけるその有用性を検証した。結果の概要は、以下のとおりである。

1．MALDI-TOF MSI の改良

従来の MALDI MSI（TOF 以外も含む）には、未解決の問題点が 3 つあった。すなわち、1）異なる化合物を一斉に分析することが困難であること、2）絶対定量性が欠如していること、および 3）検出感度に限界があり、低濃度化合物の分析に不向きなことである。本研究では、これらの課題を各々次のように解決した。

1）イチゴ果実に含まれる主要な糖および有機酸は、ヘキソース（グルコースおよびフルクトース）およびスクロースならびにリンゴ酸およびクエン酸であるものの、これら全てを MALDI-TOF MSI を用いて一斉分析した事例は見当たらない。そこで、複数のマトリクスを比較検討するとともに、正および負イオンモードで測定し、糖および有機酸の一斉分析が可能な条件を探索した。その結果、DAN をマトリクスとして負イオンモードで分析することで、果実中の糖および有機酸に加え、アスコルビン酸を一斉に検出することが可能であることを見出した。

続いて、この条件下での質量分析イメージング（MSI）画像の妥当性を確認した。MALDI MSI

では、正イオンモードの MSI 画像が負イオンモードのそれと異なる事例が報告されている。そこで、1 つのイチゴ果実に由来する 2 枚の連続切片に含まれる化合物を正および負イオンモードで各々測定し、両者の MSI 画像を比較するとともに、HPLC による定量値と比較することで、その定量性を検証しようとした。その結果、大気圧条件下で化合物がイオン化された場合、正イオンモードでは MSI および HPLC の数値が良く一致したにもかかわらず、負イオンモードでは乖離が認められた。また、高真空条件下で化合物がイオン化された場合、両方のイオンモードで MSI および HPLC の数値が良く一致したことから、信頼性の高い MSI 画像となることが確認された。また、フルクトースおよびグルコースは構造異性体であるため、これまでの MALDI MSI では、両者を区別せずヘキソースとして評価しているものの、両者のイオン化効率が大きく異なる場合、ヘキソースとして評価することが問題であることが指摘されている。そのため、本条件下でのフルクトースおよびグルコースのイオン化効率の差を明らかにし，両者の総和をヘキソースとして評価することの妥当性について検証した。グルコースおよびフルクトース標品を濃度別に質量分析した結果、濃度と信号強度の間には各々良好な比例関係が認められ、両者のイオン化効率の差は約 1.6 倍であり、既報（DHB をマトリクスに正イオンモードで分析）の約 6 倍より小さかったことから、両者を合算してヘキソースとして評価しても問題がないことが示された。

2）MSI で使用した切片と連続する切片を HPLC などで定量分析し、そのデータを組合せる定量的 MSI（q-MSI）について検討した。その結果、糖および有機酸の果実内分布が絶対定量的に視覚化できたほか、計算値である糖酸比（総糖含量/総有機酸含量）の描画も可能になった。さらに、一部のフラボノイド化合物についても、その果実分布を q-MSI で可視化することに成功した。q-MSI で視覚化できなかったフラボノイド化合物があったのは、本研究で用いた LC-MS で定性および定量ができなかったためであった。イチゴ果実に含まれるフラボノイド化合物は、糖および有機酸と比べて種類が多く、加えて標品が高価で入手しにくいため定性することが難しい。この問題を解決するには、フラボノイド化合物の精密質量測定またはタンデム MS などが可能な質量分析計の使用が求められると考えられた。

3）ABA は植物ホルモンの一つであり、ノンクライマクテリック型果実の成熟制御や、種子発芽抑制の機能を持つことが報告されている。しかし、ABA の植物組織中における存在量は微量であるため、従来の MSI による検出は困難であった。インゲンマメ種子において、+1 電荷を持つ Girard's Reagent T（GirT）で ABA を誘導体化することで質量分析による検出を容易にした報告がある。この報告での誘導体化およびマトリクスの条件に準じて、イチゴ果実中の ABA 検出を試みたものの検出できなかった。そこで、誘導体化およびマトリクスの条件を再検討し、高感度で ABA が検出可能な条件を見出した。この測定条件で測定を行うことで、イチゴ果実内 ABA 分布の可視化に初めて成功し、ABA は髄部よりも皮層部に多く存在すること、および維管束に沿って多く分布することを明らかにした。

2．イチゴ果実の品質評価における MALDI TOF q-MSI の有用性の検証

MALDI TOF q-MSI の有用性を検証するため、まず 6 品種の赤熟果を対象に糖および有機酸分布の品種間差を調査した。次に、3 品種を対象に、果実成熟段階別の糖および有機酸分布を調査した。さらに、摘葉処理が果実の糖および有機酸分布に及ぼす影響を調査した。各々の検証結果は，以

下のとおりである。

1）一季成り性イチゴ 3 品種（‘佐賀 i9 号’、‘もういっこ’および‘ゆめのか’）および四季成り性イチゴ 3 品種（‘すずあかね’、‘エッチエス-138’および‘夏のしずく’）の計 6 品種の赤熟果における糖および有機酸分布を品種間で比較した結果、品種を問わずヘキソースは皮層部部よりも髄部で、クエン酸は髄部よりも皮層部で高かった。一方、スクロース、リンゴ酸およびアスコルビン酸の分布には、顕著な品種間差が認められた。この場合、部位（髄部、皮層上部、皮層中部および皮層下部）ごとの濃度差を統計解析し、その有意性を検定できたのは q-MSI の絶対定量性に依拠しており、この手法が果実の品質評価に役立つことが実証された。

2）前項で用いた四季成り性イチゴ 3 品種を供試し、果実成熟（緑熟果、白熟果、桃熟果および赤熟果）に伴う糖および有機酸分布の推移を調査した結果、赤熟果のヘキソースおよびクエン酸分布様式は年次および栽培環境を問わずイチゴ果実に共通する一般的特徴であること、並びにこの部位間差が生じる果実成熟段階は，ヘキソースが白熟果以前，クエン酸が緑熟果または桃熟果以前であることが明らかになった。一方、それ以外の成分については変動のばらつきが大きく、品種間差が認められることが確認された。従って、果実成熟に伴う成分分布の動態を捉える手法として、この手法の有用性が実証された。

3）摘葉処理が糖および有機酸の果実内分布に及ぼす影響を HPLC および MALDI-TOF q-MSI を用いて調査し、無摘葉（対照）のそれと比較した。摘葉処理は、一株当たりの葉数が 45 枚となるように下位葉から順に取り除く作業を 6 月上旬から 10 月下旬にかけて行い、対照区では完全に枯死して褐変し、乾燥した葉のみを除去した。HPLC 分析の結果、総糖含量は摘葉区で低く、クエン酸含量は摘葉区で高いことが明らかになった。一方、MALDI-TOF q-MSI の総糖含量およびクエン酸含量の果実内分布に、処理間で有意差は認められなかった。この場合、HPLC では果実全体を均質化して分析したのに対し、MALDI-TOF q-MSI では果実縦断面の測定に限定していたことおよびサンプルサイズが小さかったことなどが結果の差に現れたものと考えられる。従って、MALDI-TOF q-MSI を果実の品質評価に用いる場合、これら点を考慮する必要があることも明らかになった。

以上のとおり、本研究では MALDI-TOF MSI 技術を様々な面から改良し、イチゴ果実の品質評価に応用可能であることを実証した。特に、MSI 画像に定量性を付与した q-MSI は、これまでできなかった試料間比較を容易にし、MALDI-TOF MSI の応用の幅を飛躍的に拡大した。従って、本研究で得られた成果は、イチゴ果実だけでなく、青果物全体の品質評価に資するものと考えられる。