

令和元年6月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04448

研究課題名(和文) 植物はいかにUV-Aを感知しどのように応答するか

研究課題名(英文) UV-A specific anthocyanin biosynthesis and protective responses in vegetable crops

研究代表者

河鱈 実之 (Kawabata, Saneyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：10234113

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,500,000円

研究成果の概要(和文)：農作物の品質に関わる紫外線応答について特にUV-Aに焦点を絞って調査をした。カブ`津田蕪`の芽生えでは、ピーク波長350nmのUV-A蛍光灯ではアントシアニン合成が誘導されるが、単波長の315～345nmではアントシアニン合成はほとんどみられず、315nmと355nmの共照射によってアントシアニン合成が誘導された。網羅的な遺伝子発現解析の結果、UV-A特異的に発現が誘導される遺伝子群があり、そのなかには、アントシアニン合成系遺伝子の他にROS応答に関わる遺伝子が多数含まれた。この間のROSの発生は明らかでなかったが、青色光によるアントシアニン蓄積ではROSの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで様々な作物においてアントシアニン合成と光との関係が調べられ、その結果、UV-Aがとりわけ重要であることが分かってきた。施設栽培では被覆資材による着色不良が生じることがある。近年普及しているLEDによる完全人工光型植物工場においては、LEDが紫外線を全く含まないため生産物の品質に負の影響が現れる懸念がある。紫外線応答を詳細に調べることにより、この課題解決の糸口が見つかることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on the UV response related to the quality of agricultural products, especially focusing on UV-A. In the seedling of 'Tsuda' turnip, UV-A fluorescent light with a peak wavelength of 350 nm induces anthocyanin synthesis. Anthocyanin synthesis was hardly observed at monochromatic irradiation of 315 to 345 nm range UV, but induced by co-irradiation of 315 nm and 355 nm. Comprehensive gene expression analysis identified a gene set which were induced specifically by UV-A, and the gene set included many genes involved in ROS related responses in addition to anthocyanin synthesis. The production of ROS under UV-A was not clear, but anthocyanin accumulation by blue light suggested the involvement of ROS in 'Tsuda' turnip seedlings.

研究分野：園芸学

キーワード：紫外線 UV-A UV-B アントシアニン ROS LED植物工場

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 紫外線は波長により誘導する反応が異なる。

太陽から照射される紫外線は植物に様々な反応を誘導する。紫外線は、その波長により UV-C (280nm 以下)、UV-B (280-320nm)、UV-A (320nm-400nm) に分けられる。太陽から放射される紫外線のうち、もっともエネルギーが強く生物に深刻な障害を与える UV-C はオゾン層に完全に吸収されて地表には届かない。UV-B の大部分はオゾン層に吸収されるが一部が地表に到達する。UV-B はちょうど DNA 塩基のフェニル基が吸収する波長であるため、低光量の UV-B であっても潜在的には物理的に DNA に損傷を与える。しかし、植物は UV-B に対して防御反応を誘導させており、UV-B 受容体である UVR8 が UV-B を感知すると短期間のうちに UV-B の強力な吸収物質であるフェニルプロパノイド類の合成が誘導される。

一方、長波長の紫外線である UV-A はオゾン層に吸収されることなく大部分が地表に到達する。そのため、地表の UV-A は紫外線のなかで最も強い。UV-A は、UV-B のように DNA などに物理的な損傷を直接与えることはないが、アントシアニンの合成、伸長成長の抑制などを誘導する。

### (2) アントシアニン合成における UV-A の役割と意義

これまで様々な作物においてアントシアニン合成と光との関係が調べられ、その結果、UV-A がとりわけ重要であることが分かってきた (Zhou et al., 2007; Wang et al., 2012)。過去の研究では、レッドレタス (佐藤ら, 2017)、ナス (Matsumaru et al., 1971)、ブドウ (Kataoka et al., 2003) を UV-A カットフィルムで覆った温室で栽培すると着色不良を起こすことが知られている。一方で、最近では UV-A カットフィルムを使った害虫防除が行われ始めているが、作物によってはハウスで内での着色不良が生じるため、こういった防除法が適用できない。完全人工光型植物工場において、一般には紫外線を含まない光源を用いるが、UV-A の効果については不明な点が多く懸念のひとつとなっている。しかし、UV-A がどのように植物に感知され、どのように種々の形態形成を誘導するのかそのメカニズムはよくわかっていない。

### (3) 光依存的にアントシアニンを蓄積するカブにおける研究から、UV-A による特徴的な反応が明らかになった。

私たちは、カブを材料に UV-A によるアントシアニン合成の誘導について研究してきた。カブには、肥大部に光が当たることによって着色する品種 (光依存型) と、光の当たらない地下部も赤く着色する品種 (光非依存型) とがある。光依存型の '津田蕪' では、アントシアニン合成は UV-A によって誘導されるが、UV-B や可視光では全く誘導されない (Zhou et al., 2007)。さらに、マイクロアレイ解析を行ったところ、UV-A では発現が誘導され、青や UV-B では誘導されない UV-A 特異的な反応を示す遺伝子セットがあることがわかった。この UV-A 特異的な遺伝子セットにはアントシアニン合成系遺伝子の多くが含まれた。このほかにも様々な実験を行ない、UV-A に対する応答は、UV-B に対する応答や青に対する応答とは本質的に特性が異なり、UVR8 やクリプトクロムを介した反応ではないことの結論に至った。

## 2. 研究の目的

アントシアニンの発現誘導や葉焼けの発生において重要な波長である紫外線の影響を、UV-A と UV-B に分けて調べ、特に紫外線照射による遺伝子発現調査によって、どのように植物が紫外線を感知し、どのような経路で応答しているのかを知ることができようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) UV-A 反応における波長特異性

地上部が紫色に着色するカブ、*Brassica rapa* '津田蕪' を 20 cm 鉢に播種し、最低気温が約 15℃ 以上に保たれた温室内で 2 ヶ月間栽培した。遮光したカブの肥大した下胚軸を 18 時間暗所に置いた後、6 時間、異なる光強度で 280~380nm の範囲の単色 UV または単色 355nm と 315nm を組み合わせて照射した。UV-A の放射強度は、肥大部から LED までの距離を変えることにより調節した。処理後、厚さ 1~2 mm、1cm 四方の表皮組織切片を切り出し、0.1% トリフルオロ酢酸を含む 1 mL のアセトニトリルに 4℃ で 48 時間浸した。アントシアニン含有量は、1 cm<sup>2</sup> の切片当たりの 530nm における光学密度 (OD<sub>530</sub>) として表した。

### (2) UV-A 特異的な遺伝子発現の網羅的解析

カブ '津田蕪' の種子 7 個を湿った濾紙上に一列に播種し、芽生えの高さが約 1cm に達するまで (48 時間)、または 2cm に達するまで (66 時間)、25℃ の暗所で生育させた。1cm のものはアントシアニン分析用に、2cm のものは遺伝子発現解析用に用いた。これらの芽生えは (1) ブラックライト (FL10BLB, Toshiba, ピーク波長 350nm、ソーダガラスで短波長紫外線をカット)、(2) 355nm LED、(3) 310nm LED のいずれかを 6 時間照射した後、さらに 18 時間暗所においた。下胚軸より上記実験と同様にアントシアニンを抽出し定量した。また、下胚軸より RNA を抽出し、リアルタイム PCR によりアントシアニン合成および ROS 代謝関連遺伝子の発現を調べた。

### (3) RNA-seq による解析

材料として '津田蕪' をもちい、上記の実験と同様に肥大部および芽生えに紫外線照射処理をおこなった。この実験で用いた芽生えは 4cm とした。照射光源は、(1) blue (470 nm LED, NSPB520S, Nichia, 10 W m<sup>-2</sup>)、(2) UV-A (UV-A fluorescent lamp, FL10BLB, 3W m<sup>-2</sup>)、(3) UV-B

(310-nm LED, T9F31C, Seoul Optodevice, 0.3 W m<sup>-2</sup>), (4) blue + UV-B (Wang et al. 2012) である。24 時間照射ののち暗所に 24 時間おき、同様にアントシアニンを定量した。また、各区から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。

#### (4) ROS の役割

紫外線照射にともなう ROS の発生を調べるため、下胚軸における ROS の消長をしらべた。暗黒下で発芽させた‘津田蕪’芽生えに、ブラックライトあるいは青色光 LED を照射し、DAB、および CM-H2DCFDA により ROS を染色した。また、芽生えに活性酸素の発生阻害剤である DPI に浸漬した芽生えに青色光照射、UV-A 照射をし、その後のアントシアニンの蓄積を測定した。

#### (5) LED 型植物工場において栽培された作物における紫外線応答

ブロッコリ‘ピクセル’、‘ハイツ’、‘ドシコ’、キャベツ‘サクセション’、コールラビ‘アスルスター’を 128 穴のプラグトレイに播種し、昼温約 25℃、夜温約 15℃ から 20℃ に保たれた植物工場内で育苗した。光源には白色 LED ランプ (Tecoled, 東神電気) を用いて、22 時から翌 6 時を暗期とする日長 16 時間のサイクルとした。これらの苗を 12 時から 18 時までの 6 時間屋外に静置した後、元の植物工場内に戻し、実験直後と 1 週間後に傷害の発生を調査した。また、一部の苗は、0.2 または 1.0 W/m<sup>2</sup> の UV-B を 14 時から 2 時間照射した。その後もとの白色光 LED 下の育苗棚へ移し、1 週間後の傷害の発生を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) UV-A 反応における波長特異性

この研究で試験した全ての波長において、短波長の照射ではアントシアニンの蓄積は光強度と直線的な関係を示さなかった。アントシアニンの蓄積は、0.05 mW/cm<sup>2</sup> より低い UV 強度では非常に低かったが、強度が増加するにつれて著しく増加し、0.1 mW/cm<sup>2</sup> でピークに達した。しかし、より高い強度では、アントシアニンの蓄積は抑制された。315nm を弱強度 (0.010 mW/cm<sup>2</sup>) に固定して 355nm を同時照射した場合、アントシアニン蓄積は 355nm 強度が増加するにつれて直線的に増加した。アントシアニン蓄積は、315nm および 355nm の紫外線を同時に照射した場合のアントシアニンの蓄積は、それぞれを独立に照射した場合のアントシアニン蓄積量の合計よりも有意に高かった。この結果は、2 つの UV 波長がアントシアニン合成の誘導において相乗効果をもつことを示した。さらに、この相乗的応答は、単色光照射によりアントシアニン合成が抑制された強さにおいても飽和しなかった。したがって、以前の実験において観察された UV-A 蛍光灯によるアントシアニン蓄積効果は、短波長 UV の定性的効果と長波長 UV-A の定量的効果との間の相乗的相互作用であるように思われた。

#### (2) UV-A 特異的な遺伝子発現の網羅的解析

ブラックライトによるアントシアニン蓄積は、光強度と共に直線的な増加を示さなかったが、それを超えると直線的に増加した 3 W/m<sup>2</sup> の閾値を有するパターンであった。UV-B が 0.1 W/m<sup>2</sup> 以上では、下胚軸上部にアントシアニンの高い蓄積が観察された。下胚軸上部および下胚軸下部は、異なる光源に反応して異なる遺伝子発現パターンを示した (Fig. 2)。下胚軸上部では、UV-A および UV-B への照射時の遺伝子発現プロファイルは類似していたが、それらは下胚軸下部では全く異なっていた。下胚軸下部では、MYB4、CAT3、PRXR1、NTRC および LOX2 は、いずれも UV-A および UV-B によって誘導されたが、他の ROS 関連遺伝子、例えばペルオキシダーゼ、スーパーオキシドジスムターゼは UV-B によって誘導された。下胚軸上部では、アントシアニンの高蓄積は、PAP1、TT8、アントシアニン

合成遺伝子群、および一酸化窒素 (NO) 関連遺伝子である NOA1 との関連が認められた。下胚軸上部における UV-B 照射の際には、最も弱い UV-B 強度でもっとも強い遺伝子発現の誘導が観察された。

以上のように、UV-A および UV-B は、いずれもアントシアニン合成を誘導するが、その誘導メカニズムは異なることが示された。さらに、いずれの反応にも ROS が関係すると思われるが、ROS の誘導に関しても異なった応答を示すことが示唆された。

#### (3) RNA-seq 解析

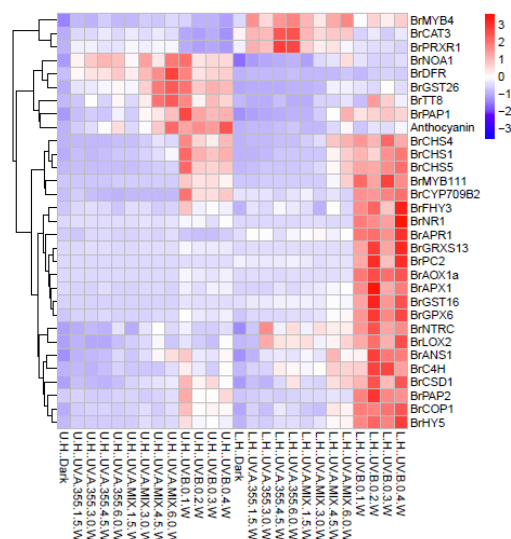


Fig.2 Hierarchical clustering of the expression of anthocyanin biosynthesis-related and ROS-related genes in ‘Tsuda’ seedlings

アントシアニン蓄積の調節シグナル伝達および紫外線によって誘発される転写調節機構の手がかりを得るために、RNA-seq を用いて UV-A および blue + UV-B を照射したカブ肥大根の表皮における遺伝子発現プロファイルを調べた (Fig. 3) . RNA-seq によって同定された 41,991 個の遺伝子のうち、754 個の遺伝子が UV-A によって特異的に調節された . これらの遺伝子のうちの 3 つは、アントシアニン生合成の構造遺伝子である CHS, DFR, ANS であった . 対照的に、アントシアニン生合成経路の初期構造遺伝子である PAL, CHI, F3H は、UV-A および青色 + UV-B の両方によって調節された . 遺伝子オンロジー解析は、ROS 関連の非特異的なシグナル伝達経路およびシステイン生合成過程経路が、UV-A 下でアントシアニン生合成経路と共に調節されていることが明らかになった .

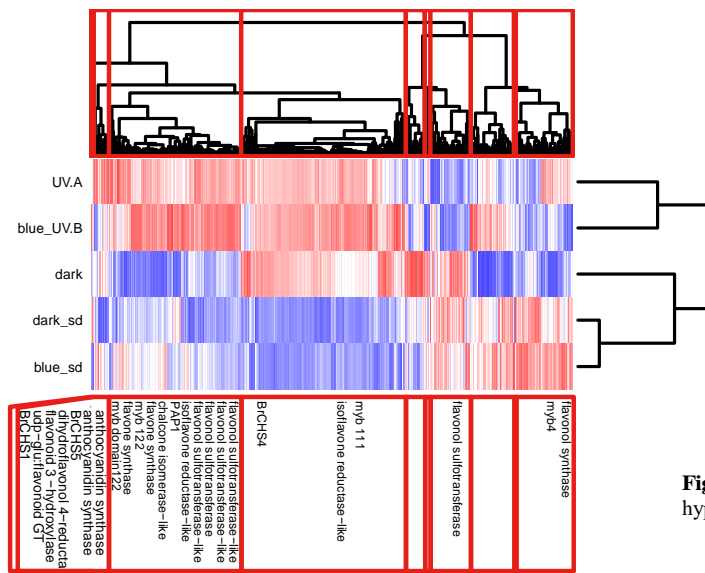


Fig.3 Heatmap of RNA-seq analysis in the hypocotyls of 'Tsuda' turnip

#### (4) ROS の役割

RNA-seq 解析の結果、UV-A 特異的に発現量が高まった遺伝子群のなかには、アントシアニン合成系遺伝子の他に、LOX2 とペプチドメチオンスルホキシド還元酵素 (PMSR) 遺伝子のホモログが多数含まれた . LOX2 と PMSR について定量 PCR を行ったところ、PMSR が UV-A 照射 1 時間後から高まりその後低下するという変化を示した .

活性酸素に対して特異的に発色をする色素 (DAB) を用いて種々の実験をおこなったが、いずれの場合も根が強く染色され下胚軸における活性酸素の発生を明らかにすることはできなかった . しかし、CM-H2DCFDA を吸収させた芽生えを用いたところ、青色光による下胚軸における ROS の発生を確認することができた . 一方、活性酸素の発生阻害剤である DPI 処理をした芽生えに青色光照射、UV-A 照射をするとアントシアニン合成の誘導は抑制された (Fig. 4) . この結果は、青色あるいは UV-A によるアントシアニン合成の誘導には活性酸素の発生が必要であることを示唆している

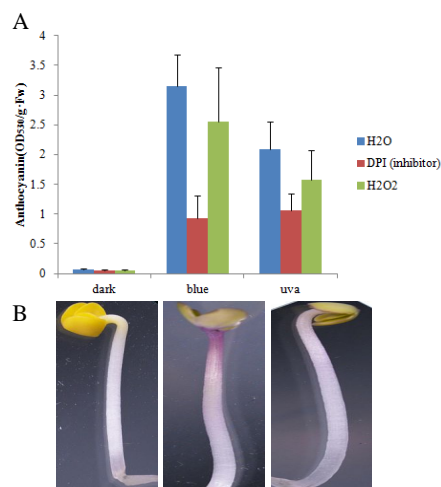


Fig.4 Anthocyanin in 'Tsuda' turnip seedlings in response to UV-A and DPI

#### (5) LED 型植物工場において栽培された作物における紫外線応答

植物はアントシアニン合成以外にも紫外線に対して反応を示す . 近年植物工場での利用が増加している LED は紫外線を全く含まないため、紫外線を含む太陽光下とは異なる生育を示す懸念がある .

蛍光灯方式の白色光 LED を用いてブロッコリ、ピクセル、ハイツ、ドシコ、キャベツ、サクセッション、コールラビ、アスルスターを白色 LED 下で 4 週間育苗した後に屋外に 6 時間静置したところ以前確認されたような本葉の褐変及び本葉外縁部の縮れは見られなかったが、ピクセルに葉焼けが確認できた . 完全人工光型植物工場の白色 LED 下で 4 週間育苗したピクセルに UV-B を照射すると本葉に葉焼けが発生した . UV-B 単独の照射と比較して、UV-B に白色光を組み合わせた照射で葉焼けの程度が有意に低く抑えられた . このことは UV-B と長波長の光との間の相互作用が存在することを示唆した . LED を用いた人工光型植物工場では紫外線が欠如しているため、その解決が重要な課題となっている . 紫外線に対する植物の応答について、そのメカニズムを解明することで、この課題解決の糸口が見つかることが期待される .

- (1) Kataoka I, Sugiyama A, Beppu K. Role of ultraviolet radiation in accumulation of anthocyanin in berries of 'Gros Colman' grapes (*Vitis vinifera* L.). Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 72, 2003, 1-6.
- (2) Matsumaru K, Kamihama T, Inada K. Covering materials with different transmission properties on anthocyanin content of eggplant pericarp. Environment Control in Biology 9, 1971, 91-97.
- (3) Wang Y, Zhou B, Sun M, Li Y, Kawabata S. UV-A light induces anthocyanin biosynthesis in a manner distinct from synergistic blue + UV-B light and UV-A/blue light responses at different parts of the hypocotyls in turnip seedlings. Plant and Cell Physiology 53, 2012, 1470-1480.
- (4) Zhou B, Li Y, Xu Z, Yan H, Homma S, Kawabata S. Ultraviolet-A specific induction of anthocyanin biosynthesis in the swollen hypocotyls of turnip (*Brassica rapa*). Journal of Experimental Botany 58, 2007, 1771-1781.
- (5) 佐藤 文生, 山内 智史, 春どり赤色リーフレタスにおける近紫外線除去フィルム被覆が生育と着色に及ぼす影響と被覆解除後の着色の回復, 園芸学研究, 16 巻, 2017, 169-175

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Wang J, Wang Y, Chen BW, Kawabata S, Li Y., Comparative transcriptome analysis revealed distinct gene set expression associated with anthocyanin biosynthesis in response to short-wavelength light in turnip. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 38, 2016, pp.134.
- (2) Jian-Fei Yang, Yun-Zhu Chen, Saneyuki Kawabata, Yu-Hua Li, Yu Wang. Identification of light-independent anthocyanin mutants induced by ethyl methane sulfonate in turnip 'Tsuda' (*Brassica rapa*). International Journal of Molecular Sciences, 査読有, Vol.18, 2017, pp.1288.  
DOI: 10.3390/ijms18071288

### 〔学会発表〕(計 1 件)

- (1) Wang Y, Yang L, Chen B, Kawabata S, Li Y. Characterization of an active mutator transposon superfamily MITE, DTM-Brr4 in Brassica rapa genome, II Asian Horticultural Congress, 2016 9.

### 〔図書〕(計 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：李 玉花

ローマ字氏名：Yuhua Li

研究協力者氏名：王 宇

ローマ字氏名：Wang Yu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。