

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07284

研究課題名(和文) レタス植物体中におけるクロロゲン酸含有量を増大させる明期延長型照明処理法の開発

研究課題名(英文) Development of lighting treatment to extend day length for increasing the chlorogenic acid content in lettuce plant

研究代表者

福田 直也 (FUKUDA, Naoya)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：80251023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：健康機能性が注目されているクロロゲン酸(CGA)に着目し、レタス植物体に安定的にCGAを蓄積させる環境要因を特定するとともに、植物体中の代謝産物変動を解析することにより、そのメカニズムの解明を試みた。レタスを環境制御室内で栽培する場合に、連続照明、青色光照射、高濃度CO₂施用ならびに根域容量の制限によって、レタス葉内のCGA含量を200 mg 100 gFW⁻¹程度まで増加させることに成功した。また、レタスのCGA含有量が増加する環境条件下での代謝産物の網羅的解析を行ったところ、レタス幼植物体においては、シキミ酸経路に対して上記のCGA高蓄積条件が刺激となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chlorogenic acid (CGA) is one of the polyphenol compounds and its health functions are expected because of the high antioxidant capacity. In this study, as we have focused on the CGA accumulation effect in lettuce plants grown under long day condition, and we tried to confirm the environmental factors to induce the higher CGA accumulation in lettuce plants for developing a new cultivation technologies to produce high CGA content lettuce in plant factory system. In the growth cabinet, the combination of continuous lighting, blue light irradiation, high CO₂ concentration and root volume restriction treatment could induce the high CGA content, approximately up to 200 mg 100 gFW⁻¹, in young lettuce plants. From results of metabolome analysis, it was shown that in the case of a young lettuce plants, the CGA accumulation conditions could give a strong stimulus for the shikimic acid pathway on the synthesis and accumulation of CGA.

研究分野：園芸学・造園学

キーワード：クロロゲン酸 植物工場 レタス 連続照明 青色光 LED シキミ酸経路 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

葉菜類の生育促進を目的とした明期延長型補光の研究を行ってきた。人工光源による明期の延長は、光合成を駆動する事件延長に伴い大きく作物の生育を促進させる一方、作物の形態形成やその他の生理機構に障害を与えてしまうことがあり、仮に光合成を行う明期の延長を行い作物の重量自体が増加しても、商品性が失われてしまう危険性がある。

植物の形態形成には、光環境が重要な働きをしている。これまで、作物生産上、特に重要な成育段階である花芽分化ならびに主茎伸長について光質が及ぼす影響を解明し、赤色光と青色光によりペチュニアの花成反応と主茎伸長が変化することを明らかにしたが、植物体中の内生ホルモンなどさまざまな生理状態が光環境に関係し、特にジベレリン酸化酵素の一部について、光条件の変化に対して遺伝子レベルで応答することを明らかにした (Fukuda et al., 2012)。また、花成誘導に関わる遺伝子群について、植物によっては光条件、特に光質が花成誘導の制御に重要であり、成長過程の性情を左右する可能性を示し、関連特許を取得した (特許第 4759746 号)。このように、光環境制御により植物生長反応をコントロールできる可能性があるが、仮に生育促進を目的とした明期延長処理を行う場合でも、光レセプターへの信号入力を、半導体型光源 (LED 等) などの新技術を活用して「光質」を制御することにより明期延長処理の「負」の影響を避け、高い生産性を達成できると考えている。なお現在、連続照明処理により葉菜類の生育を飛躍的に高める技術について開発しているが、その際、主茎や本葉の徒長など外観の異常が観察されるものの、複数種類の LED 光源の組み合わせによりその異常が抑制されることを確認している。

さらに、これまでの研究において、上記のように夜間に赤色あるいは青色光を照射した場合に、温室で栽培した数種葉菜類においてクロロゲン酸などの一部機能性物質が増加することを既に見いだしている (Sase et al., 2012)。このような連続照明は、植物にとって一種のストレス条件であり、そのことが刺激となって、代謝を大きく変動させている可能性がある。

2. 研究の目的

明期の延長や連続照明は、植物体の胚軸・主茎における異常伸長や、早期花成などの問題を引き起こす場合がある。一方で、飛躍的な生育促進や代謝の変化による含有成分変化など、明期の延長がもたらす効果が報告されている。ここでは、植物工場における生産性ならびに品質向上を目的として与える連続照明について、各光レセプターと関係する光質をベースに、単色 LED 光の組み合わせとその比率を検討し、その際の光強度やその他環境条件との相互作用の解析を行うとと

もに、連続明期において引き起こされる形態的な変化や代謝、遺伝子発現について網羅的な解析を行う。まず始めに、数種葉菜類をモデルとして、各種光質条件下における連続照明条件が植物ホルモン動態に及ぼす着目し、光環境と形態的变化に関する解析を行う。また、糖やアミノ酸、ポリフェノールなどの各種代謝産物のメタボローム解析を行い、それらに対する各光環境要素 (光質、光周期、光強度) とその相互作用も含めて評価することにより、閉鎖環境栽培システムにおける超迅速・高品質作物生産技術開発のための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) クロロゲン酸を高蓄積する光環境条件のスクリーニング

本課題では、青色ならびに赤色の各発光ダイオード (LED) を光源としたパネル光源の単独もしくは、組み合わせによる連続照明処理を行った場合の生育応答反応、主茎伸長や葉の形態形成反応を評価した。ここでは各 LED 下における形態的な変化の観察を行った。また、同じ植物体に対して、連続照明下において、波長が異なる青色 LED による照明を実施し、クロロゲン酸に青色光の波長域が及ぼす影響を評価した。

(2) 二酸化炭素濃度ならびに根域ストレス条件がクロロゲン酸蓄積に及ぼす影響

比較的クロロゲン酸蓄積促進効果が高い白色蛍光灯を光源として、光強度条件：強 ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD)、中 ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、弱 ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) として、連続照明ならびに対照区 (12 時間明期：12 時間暗期) を同時に設け、レタス幼植物体の生育ならびにクロロゲン酸蓄積効果に関する検証を行った。同時に、連続照明条件下において、更に光合成速度を増加させるための二酸化炭素濃度条件について検討を実施した。その際、二酸化炭素濃度を通常 (400ppm) と、1000ppm、2000ppm の高濃度条件を設定した上で、植物体中クロロゲン酸含有量を計測した。加えて、根域量がレタス幼植物体の生育に及ぼす影響に着目し、クロロゲン酸蓄積に根域制限が及ぼす効果の検証も実施した。

(3) クロロゲン酸高蓄積条件下における代謝産物変動解析ならびに関連酵素活性および遺伝子発現の計測

および の試験によりスクリーニングされたクロロゲン酸高蓄積環境条件 (連続明期条件、青色光照射、二酸化炭素 1000ppm、根域制限条件) 下において、レタス幼植物体の生育と代謝物質蓄積に及ぼす影響を評価した。植物体採取を行うとともに、メタボローム解析を実施した。栽培期間中、定期的に植物体を採取した上で、糖類・アミノ酸類・有機酸類・脂質類ならびに、ポリフェノール類、各種色素 (カロテン、リコピン等)、各種ビタミン類、各種植物ホルモンについて、メタボローム解析を実施し、代謝関連酵素活

性の計測を行った。加えて、同条件において植物体を採取し、次世代シーケンサーによる網羅的 RNA 転写産物解析を実施した。

4. 研究成果

(1) クロロゲン酸を高蓄積する光環境条件のスクリーニング

機能性ポリフェノールの一種であるクロロゲン酸を高含有するレタスを栽培するための最適環境条件を模索するため、生育時の光強度、光質ならびに二酸化炭素濃度といった環境要因に着目し、各環境要素がクロロゲン酸蓄積に及ぼす影響を評価すべく試験を行った。本葉展開後の幼植物体におけるクロロゲン酸蓄積に関する光質ならびに光強度の相互作用を評価したところ、連続照明による刺激の他に、最適光強度は $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (PPFD) であり、さらに光質については青色光波長域を含む約 400~500nm の領域が、レタス植物体地上部におけるクロロゲン酸蓄積を促進するために有効であることが明らかとなった (図 1)。また二酸化炭素

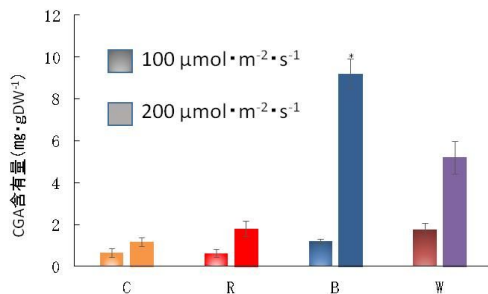


図1 異なる光質条件と光強度がレタス幼植物体中の乾物当たりのクロロゲン酸含有量に及ぼす影響。図中の記号でCは白色蛍光灯による明暗各12時間の条件を、また、R (赤色LED)、B (青色LED) ならびにW (白色蛍光灯) は、各人工光源による連続照明処理区を示す。図中のエラーバーは SE (n=6) を示す。

濃度は、連続照明との相互作用により 1000ppm の処理濃度ではクロロゲン酸蓄積に促進的に作用することが判明した。これらの条件を組み合わせた処理を行ったところ、最終的にレタス幼植物体中のクロロゲン酸濃度が $200 \text{mg} \cdot 100 \text{gfw}^{-1}$ に達し、対照区のレタスに含まれるクロロゲン酸濃度の約 20 倍の濃度となった。また、収穫前に一時的に行う連続照明ならびに二酸化炭素処理は、レタスのクロロゲン酸蓄積に効果があったことから、収穫直前のプレハーベスト処理によるクロロゲン酸蓄積促進技術の可能性も示唆された。一方、1500ppm を超える二酸化炭素濃度となると、クロロゲン酸蓄積に阻害的な働きがあることが示唆され、更に $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (PPFD) の高光強度条件で連続照明を行った場合も、高濃度二酸化炭素施与と相互的に作用してクロロゲン酸蓄積を制限した。また、光周期を段階的に変化させた場合の評価を行ったところ、明期の延長に伴いクロロゲン酸蓄積に最も効果が高くなることが判明し、

青色光による刺激に加えて、明期延長による量的促進効果があることも示唆された。

(2) 二酸化炭素濃度ならびに根域ストレス条件がクロロゲン酸蓄積に及ぼす影響

クロロゲン酸蓄積効果の安定性向上と更なる高濃度蓄積効果を達成するための地上部環境条件および根域ストレス条件の検討を進めた。連続照明処理と二酸化炭素施与処理を行う際の養液栽培培地条件について検討を行ったところ、根域容量を小型ウレタンブロックサイズに制限した場合に植物体内のクロロゲン酸蓄積濃度が安定することが示された (図 2)。また、地上部乾物率と乾物当たりのクロロゲン酸濃度の処理後の変動を比較した際、根域容量の制限処理を行った上で連続照明ならびに二酸化炭素施与処理を行った場合、地上部乾物率の上昇と乾物当たりのクロロゲン酸濃度の増加が合わさった乗数効果によって飛躍的にクロロゲン酸がレタス植物体内に蓄積することが示された (平成 28 年度園芸学会秋季大会)。さらにこの成果発表後に、本技術の特許申請を行った (特願 2016-175465)。

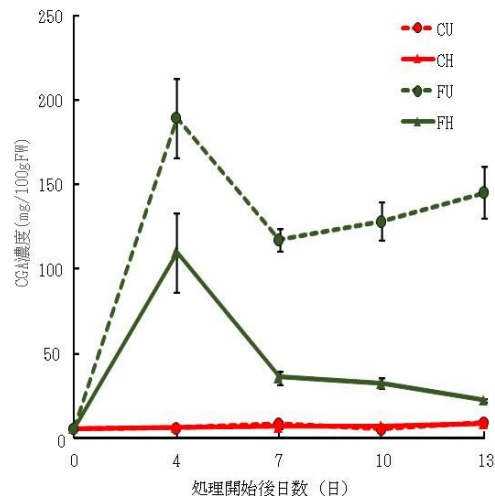


図2 CO₂濃度と連続照明処理が、異なる培地条件で栽培したレタスの生体重100g当たりのクロロゲン酸濃度に及ぼす影響。図中の記号は、CならびにFはそれぞれ対照区と連続照明および大気CO₂濃度1000ppm処理区を示す、またUおよびHはそれぞれウレタン培地のみで栽培した処理区と水耕した処理区を示す。連続照明時の光強度は $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (PPFD) とした。エラーバーは標準誤差 (n=5) を示す。

(3) クロロゲン酸高蓄積条件における代謝産物変動解析ならびに関連酵素活性および遺伝子発現の計測

クロロゲン酸蓄積に関するチャンピオンデータを越える蓄積量を達成する環境要因のスクリーニングを実施した。その結果、根域における塩類ストレスによって更に植物体中 CGA 濃度がさらに上昇することを突き止めた。この結果により筆者らは、レタス類に関して植物体中クロロゲン酸濃度を安定的に増加させる実験系を既に確立することに成功した。さらに、クロロゲン酸高蓄積条件で栽培したレタスの予備的メタボローム解

析を進め、結果としてシキミ酸からカフェ酸までの経路で CGA 高蓄積光環境応答に関連する箇所がある可能性を突き止めた(表)。ここではフェニルアラニンが減少する一方で、クロロゲン酸の構成要素であるカフェ酸含有量の大幅な増加が観察された。加えて、PAL などシキミ酸合成やカフェ酸合成に関する酵素活性測定を行った上で、クロロゲン酸高蓄積条件下で栽培しているレタス植物体に関する RNAseq 解析も実施した。その結果、クロロゲン酸含有量が増加する条件である青色光による連続照明条件下では、PAL の活性が 50% 増加することが明らかとなった。これらの結果より、青色光による連続照明ならびに根域ストレスの組み合わせによる CGA 増加に関して、PAL 活性増大を通じてカフェ酸などの物質が増大し、結果として CGA が増大した可能性が指摘された。なお、本手法によって CGA が増大したレタスの抗酸化能力を DPPH 法により評価したところ、CGA が増大しないレタスと比べて 30% 抗酸化能力が増加することが判明した。これらの結果より、本手法によって栽培されるレタスの高機能性を基に新たな商品へと展開できる可能性が示唆された。

表 青色光による連続照明条件下で栽培したレタスに含まれるクロロゲン酸 (CGA) 関連メタボローム

同定物質名	青色光連続照明処理 z	T-検定 y (5%水準)
Phenylalanine	-1.4	*
Shikimic acid	0.7	*
Caffeic acid	5.0	*
Quinic acid, 3-caffeoyl-, (CGA)	14.9	*
Quinic acid	-0.1	NS

z 数値は対照区との log₂ 値の差を示す。

y * : 赤色光対照区との間で有意差有り。NS : 有意差無し。

< 引用文献 >

Fukuda N., T. Yoshida, C. Senaha, Olsen J. E., Jikumaru Y., Kamiya Y., Short main shoot length and inhibition of floral bud development under red light can be recovered by application of gibberellin and cytokinin, *Acta Hortic.*, 2012, 956:215-222,

Sase S., Mito C., Okushima L., Kanesaka N., K. Sekiguchi, Odawara N., Fukuda N., Effects of overnight supplemental lighting with different spectral LEDs on the growth of some leafy vegetables, *Acta Hortic.*, 2012, 956:327-333,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

H. Yoshida, K. Sekiguchi, L. Okushima, S. Sase and N. Fukuda, *Acta Horticulturae* Increase in Chlorogenic Acid Concentration in Lettuce by Overnight Supplemental

Lighting and CO₂ Enrichment, *Acta Horticulturae*, 査読有, 1134, 2016, 293-300

DOI:10.17660/ActaHortic.2016.1134.39

〔学会発表〕(計 4 件)

下村未知瑠・草野都・藤内直道・有泉亨・江面浩・福田直也

赤色光または青色光照射下で栽培したレタス幼植物体中のクロロゲン酸含有量日間変動と代謝物解析, 園芸学会平成30年度春季大会, 2018年

下村未知瑠・藤内直道・吉田英生・有泉亨・江面浩・福田直也

レタス幼植物体に含まれるクロロゲン酸含量は根域環境と光周期によって変動する 園芸学会平成29年度秋季大会, 2017年

下村未知瑠・吉田英生・有泉亨・江面浩・福田直也

青色光による連続照明ならびに二酸化炭素施用処理はレタス幼植物体においてクロロゲン酸蓄積を促進する, 園芸学会平成28年度秋季大会, 2016年

H. Yoshida, K. Sekiguchi, L. Okushima, S. Sase and N. Fukuda

Increase in Chlorogenic Acid Concentration in Lettuce by Overnight Supplemental Lighting and CO₂ Enrichment 8th International Symposium on Light in Horticulture, 2015年

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: キク科植物のクロロゲン酸含有量を増加させる方法およびキク科植物

発明者: 福田直也・吉田英生・下村未知瑠

権利者: 筑波大学

種類: 特許

番号: 特願 20160175465

出願年月日: 2016 年 09 月 08 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田直也 (FUKUDA, Naoya)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：80251023

(2) 研究分担者

吉田英生 (YOSHIDA, Hideo)
筑波大学・生命環境系・助教
研究者番号：40729852