

機関番号：32639

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20780180

研究課題名（和文） 青色光照射による硝酸還元酵素の活性化は葉菜類の硝酸含量を低減させるか？

研究課題名（英文） Does the promotion of the nitrate reductase activity under blue light lead to the decrease of the nitrate content in leafy vegetables?

研究代表者

兼子 敬子（大橋敬子）(KANEKO KEIKO (OHASHI KEIKO))

玉川大学・学術研究所・准教授

研究者番号：50332599

研究成果の概要（和文）：青色光は赤色光に比べてホウレンソウ葉の NADH 依存性硝酸還元酵素（NADH-NR）活性を高める。この活性増加は木部出液中の硝酸濃度の増大に起因すると推測された。100%青色光あるいは100%赤色光を3日間照射した葉の硝酸集積量には差はなかった。青色光照射による NADH-NR の活性増大は、体内に蓄積された硝酸の消費を伴わないと判断された。このことから、青色光照射によってホウレンソウ葉の硝酸濃度を低減することは難しいと判断した。

研究成果の概要（英文）：Blue light promotes NADH-specific nitrate reductase (NADH-NR) activity in the leaves of the spinach plants more than red light. This promotion might be caused by the increase of the nitrate content in the xylem sap. The release of nitrate from the vacuole might not relate to the promotion of NADH-NR activity. These mean that nitrate stored in the vacuole of spinach leaves was not depleted. Therefore, it was difficult to control the nitrate content of the spinach leaves by blue light irradiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農業工学・農業環境工学

キーワード：生物環境調節

1. 研究開始当初の背景

光の波長成分のうち、青色光は光形態形成、光屈性や気孔開口促進に大きな作用を示すだけでなく、青色光照射によって多くの生理反応が誘導される。その一つに、硝酸を亜硝酸に還元する酵素である硝酸還元酵素活性は、赤色光照射よりも青色光照射でより活性

が高められるという興味深い青色光反応がある（Jones and Sheard 1977, Sasakawa and Yamamoto 1979）。硝酸還元酵素は、硝酸が亜硝酸を経てアンモニアに還元され、最終的にアミノ酸へと合成される一連の窒素同化反応を律速する酵素である（Sueyoshi et al. 1995）。したがって、青色光を照射すれば窒

素同化反応が促進されることによって、野菜の硝酸含量を低減させられる可能性がある。野菜に含まれる硝酸は、それ自身の毒性は低いですが、体内に入ると微量でも毒性の高い亜硝酸やニトロソ化合物を生成するため、可能な限り野菜の硝酸含量を低減させることが求められている。

他方、青色光は他の可視光成分よりも気孔の開口を促進し (Sharkey and Raschke 1981, Karlsson 1986), 蒸散速度を向上させる (Karlsson 1986). 蒸散速度の向上は植物の硝酸吸収量を増やすことにつながる。このことは一般に、植物のバイオマスを増産するのに好条件と解釈できよう。ところが植物には元来、窒素飢餓に備えて現時点では成長に必要とされない硝酸を液胞に蓄積する特性がある。そのため、青色光照射によって、硝酸還元酵素で還元しきれないほどの多量の硝酸が蒸散によって取り込まれた場合、液胞での硝酸集積の増大により植物の高硝酸含量化が招かれる可能性がある。このように、青色光の照射は植物の硝酸集積に対して相反する二つの現象を誘導させる。それゆえ、青色光照射による硝酸含量の低減化をねらう光照射技術を開発するには、あらかじめ青色光照射下において、根の吸収から体内利用までを通した硝酸分子の行方の全体像を把握する必要がある。そのためには、青色光を照射した場合の硝酸の吸収、体内での硝酸還元とそれに続くアミノ酸合成に関わる生理・生化学反応の活性 (例えば、蒸散、硝酸還元酵素活性、アミノ酸合成に関わる酵素の活性) と体内の硝酸集積量を同時一斉に解析してデータを得なければならぬ。しかしながら、そのような研究が行われた例は世界中を見渡してもない。また、青色光照射が植物の硝酸集積に対して相反する二つの現象を誘導させるという理由から、単純に青色光を播種

から収穫時までの栽培光として利用する照射法では野菜の硝酸含量を低減させるのは難しいと予想する。そこで次のステップとして、上記の硝酸吸収、還元およびアミノ酸合成に関わる生理・生化学反応活性について、青色光の照射時間 (日数) に対する特性を解析する必要がある。その結果は、野菜のバイオマス生産を高めながら、硝酸含量を低減させることを両立させる青色光照射法の確立を可能にするだろう。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、青色と赤色の発光ダイオード (LED) を用いてそれらの単独光および混合光を照射する実験を行う。2年間の研究期間を考慮して、青色光反応の観察が行いやすい設定で実験を行う。分、時単位での短期間照射と、日、週単位での照射の2つの場合分けを行う。各場合において、1) 硝酸の吸収と 2) 体内に取り込まれた硝酸の還元とアミノ酸合成に関わる生理・生化学反応の活性を測定する。具体的には、上記 1) については蒸散速度と気孔コンダクタンス測定および硝酸定量を、2) については、NR 活性測定、NR 遺伝子 *nia* の定量、各種アミノ酸の定量と炭水化物定量を行う。これらの測定は日変化を通して行う。それにより、例えば硝酸定量の結果からは1日の吸収量を推定することが可能となる。それを蒸散速度の日変化と比較することにより蒸散と硝酸の取り込みとの因果関係が見えてくる。また NR 活性と各種アミノ酸定量の日変化の結果により、1日を通しての窒素同化反応の活性化状態を推定することが可能となる。科学研究費の交付期間を配慮して、NR のカイネティクス、最適温度や最適 pH がよくわかっているホウレンソウを本実験の中心材料とする。

平成 20 年度は、分、時単位での短期間照射と、日、週単位での照射の2つの場合分け

をして、1) 硝酸の吸収と 2) 体内に取り込まれた硝酸の還元とアミノ酸合成に関わる生理・生化学反応の活性そして 3) 硝酸集積量について生化学的手法を用いて解析する。再現性ある結果を得るには反復解析が必要となる。その反復解析を1年間で行うのは困難かもしれない。その場合は平成21年度も引き続き行う。得られた結果から、平成21年度では硝酸含量を低減する青色光強度とその照射時間を割り出す。その環境下で数品種のホウレンソウを育成して、硝酸含量が低減されるか確認する。

3. 研究の方法

(1) 平成20年度

①短期的な青色光照射下におけるホウレンソウの硝酸吸収と利用

実験材料と栽培方法

ホウレンソウを実験材料にする。湛水栽培法を採用し、温湿度および光強度を厳密に制御できるグロースチャンバ（内寸；40 cm×60 cm×100 cm）内で栽培を行う。播種後5週間は55 W 白色蛍光ランプ下で光合成有効光量子束密度（PPFD）； $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温；20°C/18°C（明/暗）、明暗周期；12 h/12 h（明/暗）で育成する。この条件で育成されたホウレンソウを下記の実験1および2の実験材料として用いる。

実験1 短期的な青色光照射下におけるホウレンソウの窒素同化反応関連因子の測定と硝酸定量

実験装置と青色光照射処理

上述と同様のグロースチャンバ内にホウレンソウを移動し、短期間の青色光照射処理（以後、青色光処理）を行う。青色光処理の光源には青色LED（ピーク波長；470 nm）と赤色LED（ピーク波長；655 nm）を用いる。1枚のパネル（30 cm×30 cm）に青色と赤色のLED素子を混合して装着したLEDパネル

光源をグロースチャンバ上部に設置して、青色光、赤色光およびその混合光を照射する。各色LEDの出力は直流電源装置で調節し、点灯時間はタイマーで制御する。青色光処理について詳細に説明を付す。 $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の光強度下において、1) 赤100%区、2) 赤80+青10%区、3) 赤70%+青30%区、4) 青100%区そして5) 白色蛍光灯区（コントロール）の5つの処理区を設定する。照射時間は明期開始直後から明期終了時までの12時間とする。

測定項目

明期開始直後（0時間）から3時間ごとに明期終了時まで第2葉をサンプリングし、葉のNADH-NR活性とその活性化率、NRをコードする遺伝子 *nia* の転写量の測定を行う。

実験2 短期的な青色光照射下におけるホウレンソウ葉のガス交換速度

実験装置と青色光処理

播種後5週目のホウレンソウ葉を用いて、短期間の青色光照射下におけるガス交換速度を測定する。測定光源は実験1と同じ青色と赤色LEDを用いる。1枚のボード（5 cm×5 cm）に青色と赤色の砲弾型LEDを混合して装着したボード型LED光源をガス交換測定チャンバ（測定面積；2 cm×3 cm）上側のアクリル板上部に設置し、青色光、赤色光およびその混合光をホウレンソウ葉に照射する。各色LEDの出力は直流電源装置で調節する。青色光処理は実験1と同様とする。

測定項目

各測定光条件下および大気CO₂分圧下における第2葉の蒸散速度、気孔コンダクタンス、光合成速度および葉内CO₂分圧を測定する。

②長期的な青色光照射下におけるホウレンソウの硝酸吸収と利用

実験材料、栽培方法と青色光処理

上述の栽培装置で、ホウレンソウを播種後 5 週間育成する。次に、実験 1 と同じ LED 光源を用いて長期間の青色光処理を行う。処理区は、実験 1 と同様の青色光処理区を設定する。明暗周期は 12 h/12 h (明/暗) とする。これらを組み合わせた環境下で数日から 1 週間育成したホウレンソウを下記の実験 3 の材料とする。

実験 3 長期的な青色光照射下におけるホウレンソウの硝酸定量と窒素同化反応関連因子の測定

明期中の第 2 葉をサンプリングし、葉の硝酸集積量の測定を行う。青色光照射による葉の硝酸量低減化が認められた場合には、第 2 葉における NADH-NR 活性、*nia* 転写量、各種アミノ酸量も解析する。

(2) 平成 21 年度

平成 20 年度で再現性を確認できるほどの実験反復がとりきれない場合は、不足部分の実験反復を行う。平成 20 年からの結果をまとめて、硝酸含量を低減する青色光強度とその照射時間を割り出す。その環境下で数品種のホウレンソウを育成し、品種によらずホウレンソウの硝酸含量が低減されるのか確認する。

4. 研究成果

(1) 短期間の青色光照射はホウレンソウ葉の NADH-NR 活性を高めるか確認したところ

(図 1)、青色光が 10% 以下の区では、NADH-NR 活性は暗所下の活性値と同程度に低かった。青色光 20% 区以上では青色光が増すほど NADH-NR 活性は向上し、青色光 100% 区の活性値はコントロールと同程度であった。この活性増加は *nia* 転写量の増加を伴う傾向にあったが、有意なデータではなかった。活性化率も NADH-NR 活性と同じ傾向を示した (データは示さず)。図 2 に明期中

のある時刻において測定された光合成速度を示した。青色光割合が増すにつれて光合成速度は低下した。気孔コンダクタンスおよび蒸散速度は青色光割合によらずほぼ一定の値を示した。したがって、NR 活性の増加は青色光照射による気孔開口促進および蒸散促進に伴う窒素吸収の増大によるものではないことがわかった。

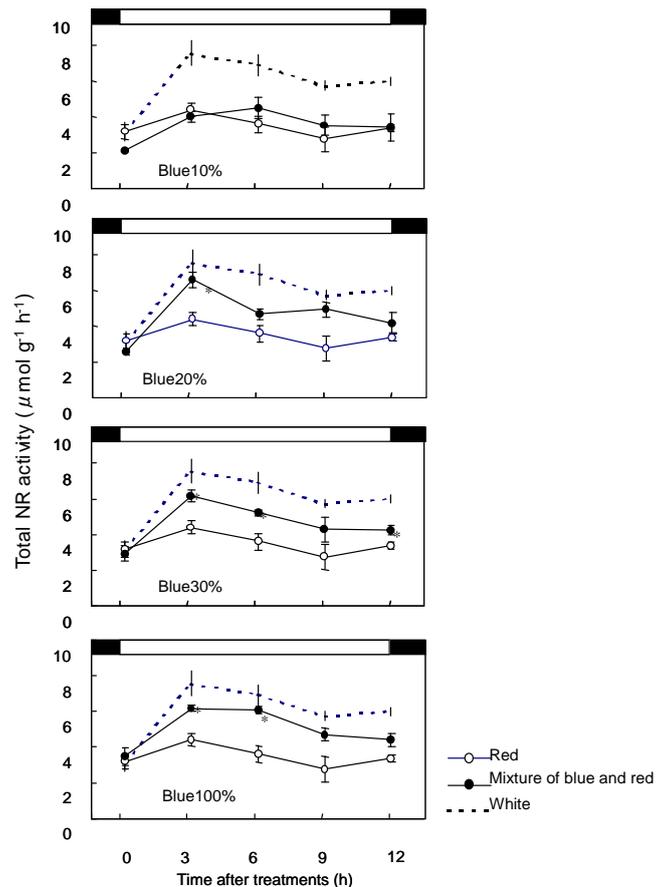


図 1. 明期中における NADH-NR 活性の経時変化。

他方、NADH-NR 活性が高められた要因を探るために、木部出液中の硝酸濃度を青色光 0 および 20% 区について解析した (図 3)。青色光 20% 区における木部出液中の硝酸濃度は青色光 0% 区よりも高く白色区と同程度の値を示した。葉の蒸散速度は青色光割合により変化しないので、根に局在する硝酸トランスポーターによる硝酸取り込みが増大したことも考えられる。このことは、体内の硝酸濃

度を高める現象であると考えられる。したがって、短期間の青色光照射であっても硝酸集積量を低減させることは難しいことであるかもしれないと予想された。

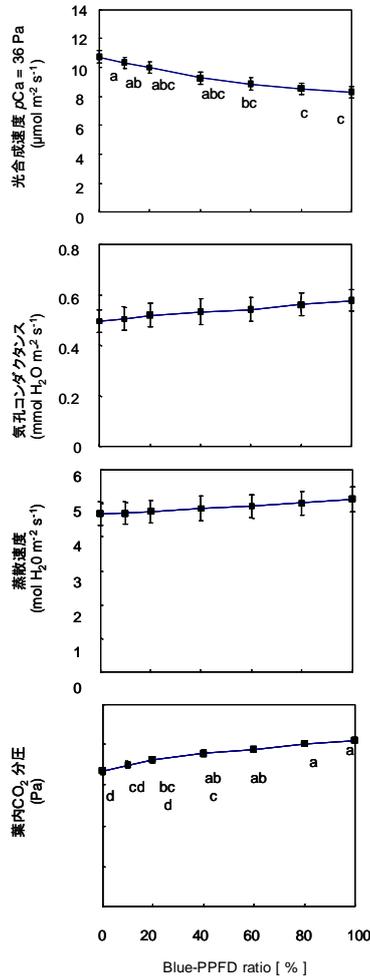


図 2. 青色光割合に対する大気 CO₂ 分圧下の各光合成パラメータ。光合成速度は明期中のある一定時刻に行った。

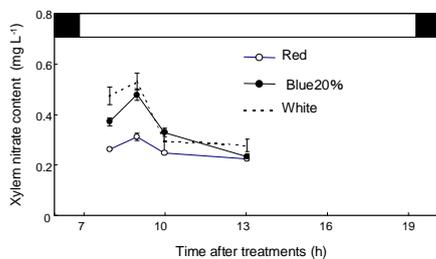


図 3. 青色光 20%区における木部出液中の硝酸濃度の経時変化

(2) 青色光照射によって体内に集積される硝酸量に差異が生じるのか調査を行った。まずは、100%青色光、100%赤色光およびコントロールとして白色光を3日間照射して比較することとした。NRの活性化による体内の硝酸消費が可能なのかを評価するために水耕液の窒素成分を光処理開始3日前から除去した。この操作により、根からの硝酸取り込みを無視することができる。

光処理開始後3日における第2葉の乾物重あたりの硝酸濃度は100%赤色光に比べて100%青色光でわずかに低いが、有意差はなかった。この時点においては第2葉乾物重および個体全乾物重も処理区間に差はない。したがって、処理区間において個体の硝酸集積量に差はないとみなされる。

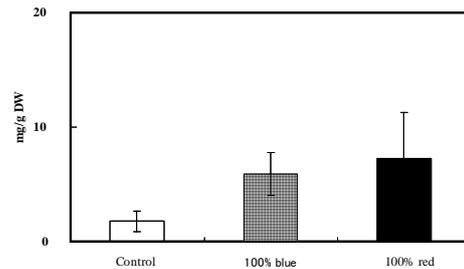


図 4. 第2葉における乾物重あたりの硝酸濃度。100%青色光、100%赤色光および白色光を3日間照射した。

(3) 研究のまとめ

青色光はホウレンソウ葉のNR活性を高めるが、この活性増加はアポプラストの硝酸濃度の増大によるものと推測され、体内に蓄積された硝酸を消費するものではないと判断された。このことから、当初の予想と大きく異なるが、青色光照射によってホウレンソウの硝酸濃度を低減することは難しいと判断した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Keiko Ohashi-Kaneko, Masahide Takase, Kenji Kurata, Low-light Irradiation at the beginning or the end of the daily dark period accelerates leaf expansion and growth in *Spinacia oleracea* L., *Environ. Control Biol.*, 48(4), 161-173, 2010, 査読有

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 松田 怜, 大橋（兼子）敬子, 人工光環境下における光質と光合成, 日本生物環境工学会スプリングフォーラム 2010「光合成：植物工場発展のキーワード」, 2010 年 3 月 20 日, 東京
- ② Keiko Ohashi-Kaneko, R. Matsuda, M. Takase, K. Kakoi, and K. Kurata, Gas Exchange Characteristics and Nitrogen Utilization in Rice and Spinach Leaves under Blue Light and Red Light, 6th International Symposium on Light in Horticulture, Nov. 18, 2009, Tukuba
- ③ 大橋敬子, 松田 怜, 梶建二, 高瀬将英, 蔵田憲次, 短期的な赤色光および青色光照射下におけるイネとホウレンソウの光合成ガス交換特性と窒素利用特性, 日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21-23 日, 名古屋

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼子 敬子（大橋敬子）

(KANEKO KEIKO(OHASHI KEIKO))

玉川大学・学術研究所・准教授

研究者番号：50332599

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし