

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21380156

研究課題名（和文）葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素活性を誘導する  
シグナル伝達物質同定研究課題名（英文）Identification of Signaling Transmitter to Activate Nitrate Reductase  
in Vegetable leaves by Near-Infrared Hyperspectral Imaging System

研究代表者

伊藤 博通 (ITOHI HIROMICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：00258063

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は硝酸イオン濃度と硝酸還元酵素(NR)遺伝子の発現量との相関を検証することである。供試作物にはコマツナを使用した。ハイパースペクトルイメージングシステムを構築し、葉面内各画素の近赤外線吸光スペクトルを測定した。検量線作成のために葉から葉片 459 サンプルを切り出し、各葉片サンプル全画素の平均吸光スペクトルを取得した。撮影後イオン分析器によって葉片サンプルの硝酸イオン濃度を測定した。中肋と葉身を区別して検量線を作成した結果、中肋と葉身共に評価データの実測値と推定値との相関係数が 0.91 以上となった。この検量線を使用して葉面内硝酸濃度分布図を作成して硝酸高濃度部と低濃度部を特定し、同時に両濃度部の NR 遺伝子発現量を RT-PCR 法とアガロースゲル電気泳動法で測定した。その結果、硝酸濃度と NR 遺伝子発現量の間には明確な相関は見られなかったが、葉内硝酸濃度上昇量が大きいと NR 遺伝子発現量が大くなる傾向が認められた。このことから硝酸濃度の上昇量は NR 遺伝子の発現を誘導する要因の一つとして考えられることがわかった。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to clarify the relationship between nitrate concentration and variation in nitrate reductase (NR) gene expression. The tested plants were komatsuna. Absorption spectra at each pixel on leaf surface were measured by using a hyperspectral imaging system. In order to derive mathematical models to estimate the nitrate concentration from absorption spectra, mean spectrum over pixels that were included in small leaf bit was measured. Nitrate concentration of the leaf bit was measured by HPLC. This measurement was applied to 459 leaf bits that included leaf blades and midribs. The mathematical models were developed for leaf blade or midrib separately. Correlation coefficient between the measured and estimated concentration of evaluation data showed more than 0.91 in both the models. These models were applied to visualize the distribution image of nitrate concentration in a leaf. Then sections of high or low concentration were detected and were cut off from the leaf. Variations of NR gene expression in the leaf sections were measured by RT-PCR and agarose gel electrophoresis methods. Results of this analysis showed that there was not clear correlation between the nitrate concentration and variation of NR gene expression. However, variations of NR gene expression tended to increase with increment of nitrate concentration from initial concentration. It was clarified that the increment of nitrate concentration was considered as one of the factors to induce NR gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

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：施設園芸・植物工場

### 1. 研究開始当初の背景

硝酸は植物の必須栄養素である窒素の供給源であるが、高濃度硝酸野菜の摂取は人体に悪影響を及ぼす可能性があるとして報告されている。従って効率のよい硝酸吸収と窒素代謝により成長の促進と低硝酸化を両立させる必要があり、このためには硝酸代謝に関する生化学的な解析が必要である。硝酸は細胞内で硝酸還元酵素 (NR) により亜硝酸へ還元されアミノ酸合成への窒素代謝経路をたどる。NR 活性が高いことが硝酸代謝の促進並びに硝酸蓄積の防止に必要となる。NR 活性を向上させるにはまず NR 遺伝子が発現して NR を合成しなければならぬ。硝酸濃度上昇により NR 遺伝子が発現することが確認されているが、葉全体の平均的な傾向として認められているに留まっており、細胞への硝酸の導入から NR 遺伝子発現までの詳細なシグナル伝達経路は不明である。

### 2. 研究の目的

葉を細かく分割して見たときに硝酸濃度が低い部分で NR 遺伝子の発現が生じる可能性があるが、この場合は硝酸以外のシグナル伝達物質がこの遺伝子発現に関与していることになる。本研究の目的は、NR 遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質を同定することである。そのために、非破壊硝酸濃度分布計測法の開発を試みた。この技術によって硝酸イオン高濃度部と低濃度部を特定し、同時に両濃度部位の NR 遺伝子発現量を計測することにより、NR 遺伝子発現を誘導するシグナルが硝酸かもしくはそれ以外の物質であるのかを検証できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 葉面内硝酸濃度分布計測

供試作物はコマツナ (はかた小松菜、*Brassica rapa* var. *peruviridis*) である。ハイパースペクトルカメラで得られるデータは空間情報 ( $x, y$ ) に加え、波長方向 ( $\lambda$ ) の3次元データで取得される。このため、空間画像の画素毎に近赤外線分光スペクトルを計測することが可能であり、ハイパースペクトルカメラは果実や野菜の内部物質の分布を可視化できるとして注目されている<sup>1)</sup>。本研究で使用したカメラは V10(デルフトハイテ

ック社製)である。このカメラの仕様は、波長分解能 9 nm、測定波長域は 400 nm から 1000 nm、ダイナミックレンジ 8 bit である。レンズは単焦点レンズ (COSMICAR 製、焦点距離 8 mm、f 値 1.4) を使用した。ハイパースペクトルイメージングシステムは、ハイパースペクトルカメラと光源装置 (Newport Stratford 社製、Oriel quartz tungsten halogen research sources 66499、250 W QTH lamp 6334)、単軸ロボット (T4、ヤマハ発動機社製)

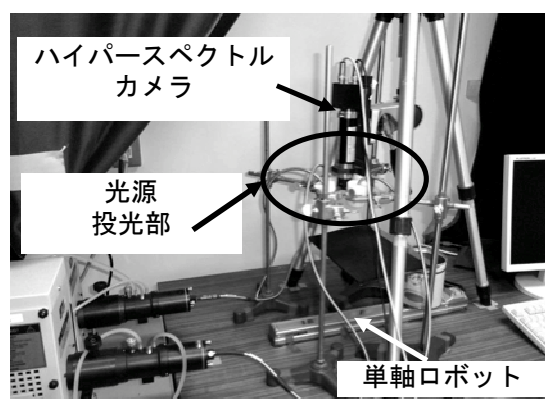


図1 ハイパースペクトルイメージングシステム

で構成されている (図1)。上記の設定により空間分解能は  $1.29 \times 10^{-4}$  m/pixel となった。

検量線作成のため約 1 cm 角に切り取った葉片サンプルを撮影した。各葉片サンプルに含まれる全画素の平均吸光スペクトルを求めた。また、撮影後の葉片サンプルからイオン分析計 (東亜 DKK(株)製 IA-300) によって硝酸イオン濃度を計測した。得られた吸光スペクトルと硝酸イオン濃度値から PCR 法と PLS 法を使用して硝酸イオン濃度を推定する検量線を作成した。検量線作成に使用したサンプルは中肋 245 サンプル、葉身 214 サンプルの計 459 サンプルで、測定サンプルの硝酸イオン濃度レンジは 40 ppm から 16413 ppm であった。また使用波長領域は 472 nm から 859 nm であり、スペクトルの前処理は中心化と標準化のどちらかを採用した。また中肋と葉身の判別は標準化スペクトルの吸光度を指標に行った。769 nm における吸光度 0.115 を閾値として判別した。

検量線作成のために中肋と葉身サンプルそれぞれを校正用データと評価用データに分割した。両データの数量比は2対1とした。評価データの推定値と実測値との相関係数を推定精度の評価に使用した。得られた検量線を葉面画像の全画素に適用し、推定値によって色分けすることにより濃度分布を作成した。

撮影実験を開始する前に葉内で硝酸イオン高濃度部と低濃度部を作り出すためにパルスチェイス法を用いた。まず作物の根を4日間水に浸し、植物体内の硝酸イオン濃度を低下させた(低下実験)。この時点で葉面の硝酸濃度分布図を作成し、硝酸が葉内に残っていないことを確認した。次に葉単位に茎で切り分け、その切り口を養液に1時間浸し、葉内で硝酸イオンを拡散させた(上昇実験)。この時点で再度葉面分布図を作成し、この分布図から硝酸高濃度部と低濃度部を特定し、実際に葉面から各部位のサンプルを採取してNR遺伝子の発現量を測定した。

#### (2) NRmRNA 発現量の計測

NR 遺伝子発現量は葉内ごく微量であり計測は困難であるため、NR 遺伝子発現量と相関があり、かつ増幅により測定可能な NRmRNA の発現量を計測した。NRmRNA 発現量計測用サンプルから RNA を抽出し、RT-PCR 法によって NRmRNA を増幅させた。RT-PCR には GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems 社製) を使用した。RT-PCR 後のサンプルをアガロースゲル電気泳動装置に導入し、画像解析によって泳動画像に現れたバンドの濃さから NRmRNA 発現量を数値化した。

### 4. 研究成果

#### (1) 硝酸濃度分布図の作成結果

最良検量線を表1に示す。 $r_{val}$ は評価用データの相関係数を表している。

	解析手法	前処理	主成分数	$r_{val}$
中肋	PLS	標準化	9	0.9102
葉身	PLS	標準化	17	0.9156

この検量線と吸光度閾値を用いて葉身と中肋の硝酸イオン濃度分布図をグレースケールで作成した。図2に濃度分布図例を示す。硝酸イオン濃度推定値が0 ppmに近いほど黒く、逆に17000 ppmに近づくほど白く表現している。濃度分布図において葉身と中肋が明確に確認できる。葉の外縁部で濃度値が高くなった主な原因は、葉身画素が中肋と誤判別されていることであると考えられる。分布図の推定精度を評価した。まず濃度分布図内における葉身部の小領域をPC上で選択し、



図2 コマツナの硝酸濃度分布

その領域内全画素の平均硝酸イオン濃度推定値を求め、次に実際の葉の同じ領域を切り出して硝酸イオン濃度実測値を測定した。両者の相関を図3に示す。相関係数が0.8686であり、実用に耐えうる精度であった。

#### (2) 葉面内高濃度部と低濃度部の濃度測定

5枚のサンプル葉についてパルスチェイス法の低下実験直後(0 min)と上昇実験後(60 min)に硝酸濃度分布図を作成した。各サンプル葉について上昇実験後の濃度分布画像から硝酸高濃度部と低濃度部を特定した。該当の領域を実際のサンプル葉から切り出した。サンプルの質量は0.08 gから0.10 gになるようにした。このとき切り出したサンプルの面積は1 cm<sup>2</sup>から2 cm<sup>2</sup>となった。このサンプルから NRmRNA 発現量を測定した。

濃度分布画像中の硝酸高濃度部と低濃度部の各領域に含まれる全画素の硝酸濃度の平均値を該当の領域の硝酸濃度測定値とした。低下実験直後の濃度分布画像からも同じ領域の硝酸濃度を測定した。その結果を図4に示す。この計測により低下実験直後から上昇実験後までの硝酸濃度上昇量を測定することができた。

図4においてサンプル番号の若い数字から順に2サンプル1組が同一葉から切り出

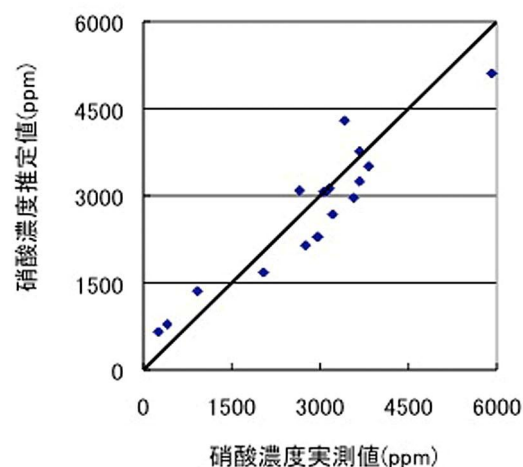


図3 分布図中の推定値と実測値の比較

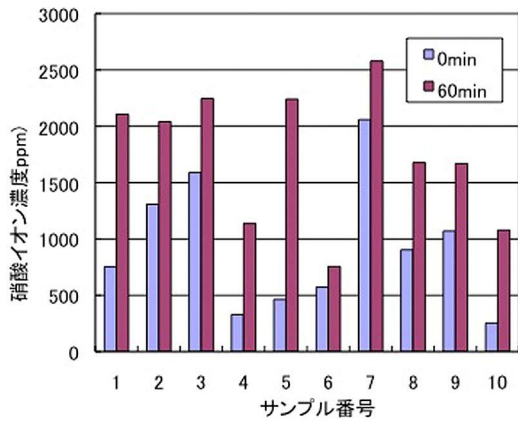


図4 高濃度部（奇数番号）と低濃度部（偶数番号）の硝酸濃度変化

したサンプルであり、奇数番が高濃度部、偶数番が低濃度部を表している。低下実験直後（0 min）に硝酸濃度が高くなっている場合もあったが、いずれのサンプルも上昇実験後（60 min）には硝酸濃度が上昇していた。低下実験直後からの濃度上昇量に一定の傾向は認められなかった。

### (3) NRmRNA 発現量計測結果

10 サンプル全てについて上昇実験後に NRmRNA の発現を確認した。電気泳動の写真撮影サンプルを図5に示す。図5に示す画像はデジタル画像であり、これを ATTO 社製ソフトウェア CS Analyzer ver 3.0 によって解析した。NRmRNA 発現量は画像中のバンドの輝度値に比例する。このため該当のバンドの輝度値をバンドの幅分積分した値を NRmRNA 発現量として測定した。なお、葉個体間の NRmRNA 発現の違いを補正するために NRmRNA を抽出したサンプルから同時に抽出したアクチンの電気泳動結果を使用した。

NRmRNA 発現量計測結果を図6に示す。サンプルの並び順は図4と同じである。この図にはパルスチェイス法の濃度低下実験直後の硝酸濃度と上昇実験後における濃度との差も示している。濃度低下実験直後の NRmRNA 発現量は測定していないが予備実験により NRmRNA 発現は無いことがわかっている。

図4と図6を比較すると上昇実験後の硝酸濃度と NRmRNA 発現量の間には明確な相関は見られなかった。サンプル5のように濃度が高い場合に NRmRNA 発現量が多くなったが、

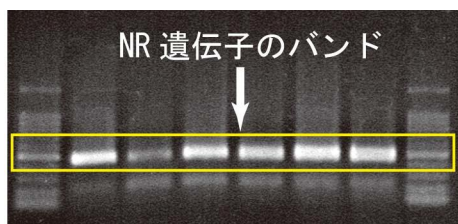


図5 電気泳動撮影結果例

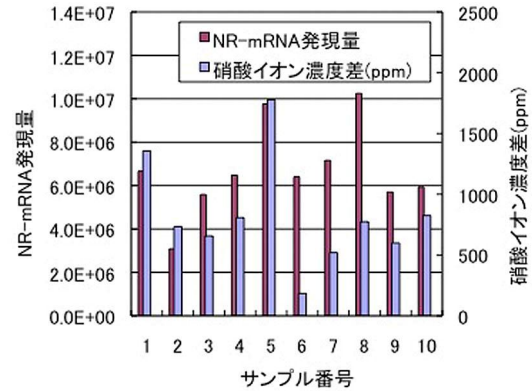


図6 NRmRNA 発現量測定結果

サンプル2のように硝酸濃度が高い場合でも NRmRNA 発現量が小さくなる場合があった。濃度低下実験直後の硝酸濃度と上昇実験後の濃度差に着目すると濃度差が大きな場合に NRmRNA 発現量が大きくなる傾向が見られた。

### (4) 結言

濃度低下実験直後の硝酸濃度と上昇実験後の濃度差、つまり硝酸を供給後に葉内硝酸濃度の上昇量が大きいと NRmRNA 発現量が大きくなる傾向が見られた。また、硝酸濃度と NRmRNA 発現量の間には明確な相関は見られなかった。このことから硝酸濃度の上昇量は NR 遺伝子の発現を誘導する要因の一つとして考えられることがわかった。

### (5) 参考文献

- 1) H. Itoh, S. Kanda, H. Matsuura, N. Shiraishi, K. Sakai, A. Sasao : Measurement of Nitrate Concentration Distribution in Vegetables by Near-Infrared Hyperspectral Imaging, Environment Control in Biology 48 (2), pp. 37-49, 2010

### 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 11 件)

- ① 伊藤博通, 松浦丈喜, 藤田裕子, 北秋広徳, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定-葉面内硝酸イオン高濃度部と低濃度部の特定-, 農業機械学会関西支部報, 110, 44, 査読無
- ② 伊藤博通, 松浦丈喜, 北秋広徳, 藤田裕子, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達

- 物質同定-硝酸還元酵素遺伝子発現量と硝酸イオン濃度との関係-, 農業機械学会関西支部報, 110, 45, 査読無
- ③ Itoh, H., Tomita, H., Uno, Y., Shiraishi, N. (2011): Development of Method for Non-destructive Measurement of Nitrate Concentration in Vegetable Leaves by Near-infrared Spectroscopy, Reprints of the 18th IFAC World Congress, CD-ROM (6 頁), 査読有.
- ④ Matsuura, H., Itoh, H., Tomoda, S., Shiraishi, N., Uno, Y. (2010): Identification of Signaling Transmitter to Activate Nitrate Reductase in Vegetable Leaves by Near-Infrared Hyperspectral Imaging System, AGRICONTROL 2010 IFAC International Conference Preprints, CD-ROM (6 頁), 査読有.
- ⑤ 伊藤博通, 神田晋佑, 松浦丈喜, 白石齊聖, 宇野雄一, 友田小百合 (2010): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素活性を誘導するシグナル伝達物質同定 -ハイパースペクトルイメージングシステムの開発-, 農業機械学会関西支部報, 108, 62, 査読無.
- ⑥ Kanda, S., Itoh, H., Matsuura, H., Tomoda, S., Shiraishi, N., Sakai, K., Sasao, A. (2010): Development of Hyperspectral Imaging System to Measure Spatial Distribution of Nitrate Concentration in Vegetables, Proceedings of ISMAB 2010 JAPAN, CD-ROM (6 頁), 査読有.
- ⑦ Itoh, H., Kanda, S., Matsuura, H., Shiraishi, N., Sakai, K., SASAO, A. (2010): Measurement of Nitrate Concentration Distribution in Vegetables by Near-Infrared Hyperspectral Imaging, Environment Control in Biology, 48(2), 31-43, 査読有.
- ⑧ 伊藤博通, 神田晋佑, 松浦丈喜, 笹尾 彰, 酒井憲司 (2009): ハイパースペクトルカメラによる野菜株内硝酸イオン濃度分布計測, 農業機械学会関西支部報, 106, 32, 査読無.
- ⑨ 伊藤博通, ツェンコヴァルミアナ, 白石齊聖, 宇野雄一, 松本拓也, 白居祐希 (2009): 光環境制御による葉菜中硝酸イオン濃度低減化技術の開発-近赤外線分光法による硝酸濃度非破壊計測法の開発-, 農業機械学会関西支部報, 106, 25, 査読無
- ⑩ Matsuura, H., Itoh, H., Kanda, S., Shiraishi, N., Sakai, K., Sasao, A. (2009): Measurement of nitrate concentration distribution in vegetables by hyperspectral camera, Proceedings of BIO-ROBOTICS IV, CD-ROM (6 頁), 査読有.
- ⑪ Matsumoto, T, Itoh, H., Shirai, Y., Shiraishi, N., Uno, Y. (2009): Non-destructive measurement of nitrate concentration in vegetables by near infrared spectroscopy, Proceedings of BIO-ROBOTICS IV, CD-ROM (6 頁), 査読有.
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一, 藤田裕子, 宮地大樹 (2012.3.5): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定, 農業機械学会関西支部第 127 回例会, 京都
- ② 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一, 友田小百合, 濱田佳代, 萩野伸祐, 綾田晃士, 北秋広徳, 野村耕太, 藤田裕子 (2011.12.25): 近赤外線分光法による植物体内硝酸イオン濃度非破壊計測法開発、第 12 回 計測自動制御学会 システムインテグレーション部門 講演会 S I 2 0 1 1、京都
- ③ 北秋広徳, 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一, 松浦丈喜, 藤田裕子 (2011.9.8): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した NR 遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定, 日本生物環境工学会 2010 年北海道大会, 札幌
- ④ Itoh, H. Tomita, H. Uno, Y., Shiraishi, N. (2011.8.29): Development of Method for Non-destructive Measurement of Nitrate Concentration in Vegetable Leaves by Near-infrared Spectroscopy, 18th World Congress of the International Federation of Automatic Control (IFAC), Milano
- ⑤ 伊藤博通, 松浦丈喜, 藤田裕子, 北秋広徳, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011.3.2): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定-葉面内硝酸イオン高濃度部と低濃度部の特定-, 農業機械学会関西支部第 125 回例会, 堺
- ⑥ 伊藤博通, 松浦丈喜, 北秋広徳, 藤田裕子, 白石齊聖, 宇野雄一 (2011.3.2): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素遺伝子発現を誘導するシグナル伝達物質同定-硝酸還元酵素遺伝子発現量と硝酸イオン濃度との関係-, 農業機械学会関西支部第 125 回例会, 堺
- ⑦ Matsuura, H., Itoh, H., Tomoda, S., Shiraishi, N., Uno, Y. (2010.12.7): Identification of Signaling Transmitter to Activate Nitrate

- Reductase in Vegetable Leaves by Near-Infrared Hyperspectral Imaging System, AGRICONTROL 2010 IFAC International Conference, Kyoto
- ⑧ 松浦丈喜, 伊藤博通, 友田小百合, 白石齊聖, 宇野雄一 (2010.9.14): 葉面内硝酸濃度分布計測法を援用した硝酸還元酵素活性誘導のシグナル伝達物質同定 -葉面内硝酸イオン濃度分布の経時変化計測-, 第69回農業機械学会年次大会, 松山
- ⑨ 松浦丈喜, 伊藤博通, 友田小百合, 白石齊聖, 宇野雄一 (2010.9.8): 硝酸還元酵素活性の誘導シグナル伝達物質同定のための葉面内硝酸濃度分布計測, 日本生物環境工学会2010年京都大会, 京都
- ⑩ 松浦丈喜, 伊藤博通, 神田晋佑, 笹尾 彰, 酒井憲司 (2010.8.31): ハイパースペクトルカメラを使用した野菜葉内硝酸イオン濃度分布計測, 農業機械学会関西支部第124回例会, 岡山
- ⑪ Matsuura, H., Tomoda, S., Shiraishi, N., Uno, Y., Itoh, H. (2010.7.27): Measurement of nitrate concentration distribution in vegetable leaves by near-infrared hyperspectral imaging, 1st International Symposium on the Nitrogen Nutrition of Plants, Inuyama
- ⑫ Kanda, S., Itoh, H., Matsuura, H., Tomoda, S., Shiraishi, N., Sakai, K., Sasao, A. (2010.4.6): Development of Hyperspectral Imaging System to Measure Spatial Distribution of Nitrate Concentration in Vegetables, International Symposium on Machinery and Mechatronics for Agriculture and Biosystems Engineering (ISMAB) 2010 JAPAN, Fukuoka
- ⑬ 伊藤博通, 神田晋佑, 松浦丈喜, 笹尾 彰, 酒井憲司 (2009.9.16): ハイパースペクトルカメラによる野菜葉面内硝酸イオン濃度分布の計測法開発, 農業環境工学関連学会2009年合同大会, 東京
- ⑭ 松浦丈喜, 伊藤博通, 神田晋佑, 白石齊聖, 酒井憲司, 笹尾 彰 (2009.9.8): ハイパースペクトルカメラによる野菜内硝酸イオン濃度分布の計測法開発, 日本生物環境工学会2009年福岡大会, 福岡
- ⑮ 松本拓也, 伊藤博通, 白居祐希, 白石齊聖, 宇野雄一 (2009.9.8): 近赤外線分光法による野菜内硝酸イオン濃度非破壊計測法の開発, 日本生物環境工学会2009年福岡大会, 福岡
- ⑯ Matsuura, H., Itoh, H., Kanda, S., Shiraishi, N., Sakai K., Sasao, A. (2009.9.10): Measurement of nitrate concentration distribution in vegetables by hyperspectral camera,

Bio-Robotics IV, Illinois, USA

- ⑰ Matsumoto, T., Itoh H., Shirai Y., Shiraishi, N., Uno, Y. (2009.9.10): Non-destructive measurement of nitrate concentration in vegetables by near infrared spectroscopy, Bio-Robotics IV, Illinois, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 透過型近赤外線分光計測装置および透過型近赤外線分光計測方法

発明者: 伊藤博通, 白石齊聖, 宇野雄一

権利者: 神戸大学

種類:

番号: 特願2010-198383

出願年月日: 2010年9月3日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 博通 (ITOH HIROMICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 00258063

### (2) 研究分担者

白石 齊聖 (SHIRAISHI NAOMASA)

神戸大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 00304121

宇野 雄一 (UNO YUICHI)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 90304120