

## 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 5月25日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：22780232

研究課題名 サーカディアン共鳴現象の解明と応用による高機能組換えレタスの高生産

研究課題名（英文） High production of a transgenic lettuce through an application of circadian resonance

研究代表者 福田 弘和（HIROKAZU FUKUDA）  
 大阪府立大学・大学院工学研究科・助教  
 研究者番号：90405358

研究成果の概要（和文）：植物の体内時計（サーカディアンリズム）が昼夜サイクルと“共鳴”すると、植物の成長や光合成効率が最大になる。この現象はサーカディアン共鳴現象と呼ばれ、レタスにも観察できることから閉鎖型植物工場でも十分な効果が期待できる。この現象は時計遺伝子の遺伝子発現レベルにおける共鳴現象に起因すると推測されており、メカニズムの解明によって分子レベルの制御への発展も期待できる。そこで本研究では、（1）多様な人工環境を実現できる閉鎖型植物工場の機能を活かしたパルス同期制御法の研究、（2）体内時計の最適化によってもたらされる生育促進効果やタンパク質生成促進効果、形態形成へ与える影響などを数値化し評価する、ことを行った。

研究成果の概要（英文）：

When the circadian clock of the plant synchronizes to the environmental cycles, the growth and photosynthesis rates take a higher value. This phenomenon is called circadian resonance and it may be useful in the plant factory for lettuce because lettuce can observe it. It is supposed that this phenomenon is caused by the resonance in the gene expression of clock genes and can expect the development to the control of the molecular level by elucidation of the mechanism. Therefore, in this research, following subjects were addressed: (1) a control of synchronization between circadian clock and environmental cycle using light pulse, (2) effect of that clock control to the growth, morphology and the production of luciferase protein in plant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：植物工場、体内時計、ルシフェラーゼ発光、同期制御、遺伝子組換えレタス、時計遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

植物の環境応答、特に光合成・光環境応答に対する最適化技術は、農林水産生物に飛躍的な機能向上をもたらす重要な技術的ニーズの一つである。近年、光環境応答の主要な生理機構としての体内時計が、遺伝子レベルから個体レベルにわたって研究され、メカニズムの解明が飛躍的に進んでいる。多くの生物において、代謝活動は体内時計に調節され、一日の昼夜サイクルの下で最も効率良く働くよう遺伝的にプログラムされている。例えば、植物は朝方から昼間にかけて光合成の効率が上昇し、夜間は糖輸送の代謝効率が上昇する。代謝サイクルの最適化は、人工的な昼夜サイクルを生み出す閉鎖型植物工場においては特に重要である。

代謝サイクルの最適化には、工学的なアプローチが有効である。例えば、共鳴現象は最も基本的で有効な工学的手法であるが、近年、植物の代謝においても共鳴現象が報告されている (Dodd, Science 2005)。それは、サーカディアン共鳴現象と呼ばれる現象で、体内時計が生み出すサーカディアンリズムと周期が一致する明暗サイクルの条件下で、成長速度や葉緑素濃度が最大になる。また、体内時計は光合成遺伝子や細胞伸長遺伝子を含む400程度程度の遺伝子群の発現タイミングを調節し、代謝のバランスを整えていることで知られる (Harmer, Science 2000)。このため、体内時計の働きを無視して一定な連続明条件などで栽培すると、作物の成長や形態形成などに異常が生じる。このような理由から、体内時計に着目した代謝サイクルの最適化技術は、閉鎖型植物工場における技術的ニーズの一つとなっている。

一方、我々は最近、レタスでもサーカディアン共鳴現象が生じることを明らかにした (図2)。さらに我々は、レタスのサーカディアンリズムを遺伝子レベルでリアルタイムに非破壊非侵襲にて計測するルシフェラーゼ発光計測技術 (ホタルの発光遺伝子を時計遺伝子のプロモーター領域に組み込み、発光により遺伝子発現をモニターする技術) を確立することに成功している (図3)。これらの研究成果と、申請者の非線形物理学におけるバックグラウンド (H.Fukuda, Phys. Rev. Lett. 2007) を融合すれば、レタスのサーカディアン共鳴現象を解明し応用することは十分可能であると考えられる。サーカディアン共鳴現象の理論モデルを構築し、それを応用することは、レタス植物工場における光環境応答に対する最適化技術の発展に大きく貢献できると期待される。

## 2. 研究の目的

体内時計制御に関する上述の基礎研究を植物工場の実用化技術へと発展させるには、

基礎段階として以下の3つの課題を克服しなければならない。

(1) サーカディアン共鳴現象は体内時計の最も基本的な最適化現象である。そこで、サーカディアン共鳴現象のメカニズムを解明し、体内時計最適化の基礎知見を得る。

(2) 多様な人工環境を実現できる閉鎖型植物工場では、最適解 (最適な環境条件) も多様であると考えられる。そこで、多様な光条件をデザインすることができるパルス同期制御法をさらに発展させる。

(3) 体内時計の最適化によってもたらされる生育促進効果やタンパク質生成促進効果、形態形成へ与える影響などを数値化し、評価する。

## 3. 研究の方法

(1) サーカディアン共鳴現象のメカニズムの解明

・研究の進め方

ルシフェラーゼ遺伝子導入レタスを用いて、様々な周期をもつ明暗サイクル条件におけるサーカディアン共鳴現象を詳細に観察する。

明暗サイクルとサーカディアンリズムの位相関係を解析し、サーカディアン共鳴現象のメカニズムを解明する。

・予想される問題点とその解決策

サーカディアン共鳴現象の最適解 (最適周期) は、植物種や照度や光質に依存すると考えられる。そこで、グリーンウエーブレタスやシスコレタスなどの3品種において、最適周期の解明を行なうと共に、赤色LED光や赤青混合LED光 (赤青比8:2など) の場合における最適周期解を求める。

サーカディアン共鳴現象のメカニズムの解明には、明暗サイクルとサーカディアンリズムの位相関係を綿密に調べることが重要であると考えられる。そこで、評価の精度を高めるために、数理モデルを作成し、コンピューター・シミュレーションを利用しながら解析を行なう。

・具体的な研究手法など

赤色または青色のLED光の条件下で、遺伝子組換えシロイヌナズナとレタスのルシフェラーゼ発光を非破壊非侵襲でモニターする。発光時系列は時計遺伝子CCA1の発現時系列に対応しているので、そこからサーカディアンリズムの位相情報や振幅情報を抽出し、明暗サイクルに対する位相関係を求める。

平成23年度以降の計画

(2) パルス同期制御法の開発

・研究の進め方

ルシフェラーゼ遺伝子導入レタスを用いて、各種パルス刺激 (赤色パルス光、青色パルス光) に対するサーカディアンリズムの応答関数を求める。

位相応答関数を利用した同期現象の数理モデルを作成し、コンピューター・シミュレーションを行なう。

コンピューター・シミュレーションで得られた最適解を、実験で観察する。

#### 4. 研究成果

(1) 多様な人工環境を実現できる閉鎖型植物工場では、最適解（最適な環境条件）も多様であると考えられる。そこで、多様な光条件をデザインすることができるパルス同期制御法をさらに発展させることを目的に行った。

まず、1. ルシフェラーゼ遺伝子導入レタスを用いて、各種パルス刺激（赤色パルス光、青色パルス光）に対するサーカディアンリズムの応答関数を求めた。次に、2. 位相応答関数を利用した同期現象の数理モデルを作成し、コンピューター・シミュレーションを行なった。3. コンピューター・シミュレーションで得られた最適解を、実験で検証した（図1）。

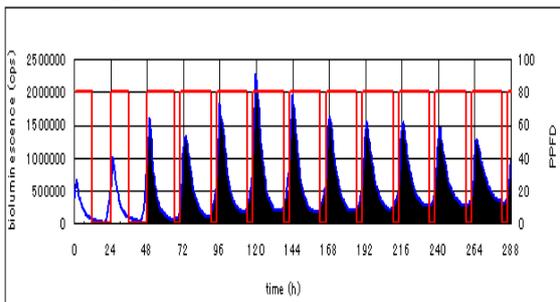


図1 遺伝子組み換え体 *CCA1::LUC* におけるルシフェラーゼ発光量 (LUCタンパク質の生産量)

(2) 体内時計の制御が生育やタンパク質生成、形態形成に与える影響に関する研究は、体内時計の状態を正確に計測し制御する技術がこれまで無かったため、研究そのものが不可能であった。そこで、パルス同期制御法などを利用して、このような研究を可能にできる手法の研究を試みた。今回、生重量、乾物重、クロロフィル濃度、ルシフェラーゼタンパク質の生成量に関する定量を行い、体内時計制御の生産性への影響を明らかにした。

#### 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2件)

- ① H. Fukuda, T. Ichino, T. Kondo, H. Murase, Early diagnosis of productivity through a clock gene promoter activity

using a luciferase bioluminescence assay in *Arabidopsis thaliana*, *Environ. Control Biol.*、査読有、49 巻、2011、51 - 60

- ② 大矢智子, 川上浩司, 福田弘和, ユーザの行動と人工環境の相互関係に基づく空間利用の可視表現の枠組み、*日本感性工学会論文誌*、査読有、10 巻、2011、535 - 542

〔学会発表〕(計6件)

- ① 福田弘和、医薬品を生む分子診断型植物工場の開発、関西ビジネスマッチング：特別フォーラム「植物工場一働き出した関西2大拠点」(招待講演)、2011年7月28日、大阪市
- ② 東孝信、西川修平、福田弘和、ルシフェラーゼ発光計測法を用いたレタスの概日リズム解析、*日本生物環境工学会*、2011年9月8日、北海道大学
- ③ 鶴飼和也、金麗和、福田弘和、レポーター遺伝子を用いたレタスの根における体内時計の空間計測、*日本生物環境工学会*、2011年9月8日、北海道大学
- ④ 池田心平、福田弘和、分子時刻表を用いた遺伝子発現レベルにおけるサーカディアンリズムの解析、*日本生物環境工学会*、2011年9月8日、北海道大学
- ⑤ 福田弘和、村瀬治比古、時計遺伝子の発現活性に着目した植物の生産性診断、*日本生物環境工学会*、2011年9月8日、北海道大学
- ⑥ 福田弘和、Striped moving pattern and self-desynchronization of circadian rhythm in plant roots、*生体生理工学会*(招待講演)、2011年9月22日、立命館大学

〔図書〕(計1件)

福田弘和、シーエムシー、体内時計の科学と産業応用：第17章「体内時計制御の植物工場への応用」、2011、13

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：植物栽培方法及び体内時計最適化植物栽培装置

発明者：福田弘和

権利者：大阪府立大学

種類：PCT/JP2012/51784

番号：

出願年月日：24年1月27日

国内外の別：外国

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.me.osakafu-u.ac.jp/bioproduction/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 弘和 (FUKUDA HIROKAZU)

大阪府立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：90405358