

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25292150

研究課題名(和文)植物のストレス防御反応を利用した植物工場野菜の高付加価値化環境制御法の開発

研究課題名(英文)Development of environmental control method producing high value-added vegetables using plant's stress defense reaction

研究代表者

清水 浩(Shimizu, Hiroshi)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：50206207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では甘味植物であるステビアを対象として、環境刺激をストレスとして与えることで甘味成分の生合成を促進する手法を開発した。具体的には植物工場などの園芸施設で刺激として与えることが比較的容易である光環境に着目した。その結果、R/FR 1.22 条件区と青色光条件区でSGs量が向上することが明らかとなった。また、8 h 明期の4 h 連続暗期を中断させるNI-FL 50条件区で効果があり、これまでにステビア栽培で最適とされている16 h 明期と比べると3/5のDLIで、約4.5倍ものSGs量が上昇することが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method to promote the biosynthesis of sweet ingredients (SGs) in Stevia which is a sweet plant by applying environmental stimulus as stress. Specifically, we focused attention on the light environment which is comparatively easy to give as a stimulus at horticultural facilities such as plant factories. As a result, it became clear that the SGs amount improves in the R / FR 1.22 condition and the blue light condition. Regarding light intensity and irradiation pattern, DLI is effective in the NI - FL 50 conditional section which interrupts the 4 h continuous dark period of 8 h light period, and 16 h light which has been regarded as optimal for Stevia cultivation so far. It was found that SGs amount increased by about 4.5 times at 3/5 DLI compared with the period. In other words, it was suggested that the SGs amount could be obtained while minimizing the input power energy in the NI - FL 50 condition.

研究分野：植物環境工学

キーワード：施設園芸・植物工場 高付加価値 遺伝子発言 環境調節

### 1. 研究開始当初の背景

現在、露地野菜は品種改良等によってほぼ一年中出回っている品目が多くあるが、旬以外に収穫されるものは栄養価が低いものが多い。たとえば夏採りホウレンソウは冬採りに比べてアスコルビン酸含有量が 1/8 程度しかない。人工光型植物工場では夏季でも冬の環境を創出すればアスコルビン酸含有量が多いホウレンソウの生産できるが、それでは栽培期間が長くなり生産効率が悪く植物工場の特徴を生かせない。実はアスコルビン酸は植物がストレスを受けたときに発生する活性酸素を消去する系の基質であり、冬季に収穫されるホウレンソウは低温がストレスになってアスコルビン酸量の生合成量が増加している。したがって、植物がストレスとを感じる環境要因を見出せばアスコルビン酸の含有量を増加させることが期待できる。同様に同じビタミン類であるビタミン E、 $\beta$ -カロチンも露地野菜で季節変動の大きい成分であり、またこれらもストレスによって生じた活性酸素に対する生体内抗酸化物質として働くことが知られている。アスコルビン酸など植物の生合成系は、一般に前駆体が酵素によって次々に代謝産物に変化していき、最終的な合成物になる。このような系では関与する酵素の一つでも働かなくなると生合成はストップしてしまう。しかしもしその酵素を発現する刺激が既知であれば、その刺激を与えることで生合成量が増加する可能性が高い。このようにさまざまなストレス刺激と各酵素発現量の関係を定量的に把握することで、単一のストレス刺激だけではなく、それらを組合せることによって生合成量を促進する効果的で先進的な環境調節が可能となる。

### 2. 研究の目的

本研究は植物工場内で、環境を調節してステビアの甘味成分の豊富な植物体を作出し、露地栽培の生育条件では得られないような付加価値を高めることを目指す。この際に膨大な数の環境条件の選抜が必要となるが、ステビアは遺伝子情報が公開されているため、初期の挙動である遺伝子の発現量変化に着目した。これにより、従来の収穫期の成分分析より早期の育苗期で、最適環境刺激の選抜が可能となる。

### 3. 研究の方法

#### ①供試植物の準備

ステビアは他の園芸植物のように育種が進んでいないため、個体間のばらつきが大きい。そのため本実験では 1 つの親株から栄養繁殖を行い、実験用個体を用意した。事前実験には大きくわけて 2 つ行った。1 つ目は最適な栄養繁殖の方法の検討で、2 つ目は親株の選抜である。1 つ目の検討として挿し穂か茎挿しの比較を行った。挿し穂は、茎頂から

の数 cm 切り取り、パーミキュライト (G20-60L, NITTAI. Co., Ltd. Osaka, Japan) に対して垂直に挿した。茎挿しは、先端ではない茎部分を数 cm 切り取り、パーミキュライトに垂直に挿した。結果、挿し穂の手法では茎頂から新たに葉が展開し、側芽を出すことなく縦方向へ伸長した。一方の茎挿しの手法では、主茎から側芽を出すのみで縦方向の伸長がみられず、形態変化の評価が難しかった。そこで本実験の栄養繁殖には挿し穂を採用した。1 つの親株から挿し穂を行い、異なる光質条件に移し変えるまでの栽培条件は同一である。挿し穂から 2 週間後には 16 の異なる光質条件を 6 回に分けて栽培をおこなった。光源には 3 種類の LED パネル (ISL-305X302-RFGB, ISL-305X302-H4RFGB, ISL-150X150-FR, CCS Inc., Kyoto, Japan), FL (100MHF142DR, Monocoqtex, Inc. Tokyo, Japan) を用い光合成光量子束密度 photosynthetic photon flux density (PPF) は  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に設定した。LED は R, B, FR がそれぞれ独立して光強度が変更できるものを利用した。

事前実験ではパーミキュライトを使用した土耕で繁殖方法の検討と、親株の選抜試験を行ったが、植物工場では水耕で栽培を行うため、本番の試験ではグロースチャンパー内 (KCLP-1000ICT, Nippon Medical & Chemical Instruments Co., Ltd., Osaka, Japan) で、水耕栽培を行った。そのためパーミキュライトに挿すのではなく、ウレタンスポンジに挿し穂を行った。すべての挿し穂は約 4 cm ほどの第 3 葉までがついたものをカミソリで道管の給水面積を広げるために斜めに切り使用した。この時、挿し穂が蒸散しすぎないように茎頂から第 3 葉だけ半分に切り落とし、メネデール 1/100 希釈液 (Menedael, Menedael Co. Ltd. Osaka, Japan) に穂を 1 時間浸した。その後カットした部分に発根剤 (Rooton, Sumitomo Chemical Garden Products, Tokyo, Japan) をつけて、ウレタンスポンジに挿した。その後 2 週間同一の条件 (日長: 明期/暗期 = 16 h/8 h, 温度: 明期/暗期 =  $24^{\circ}\text{C}/20^{\circ}\text{C}$ , 光強度 =  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 湿度 = 99%) 下で栽培した。この間、栽培バットを空気穴をあけたラップで覆い、ウレタンスポンジは根部分に光があたらないようセルトレイに挿し込み、メネデール 1/100 希釈液をウレタンスポンジが半分浸かる程度加えて 1 週間に 1 度交換した。

#### ②光質実験の試験区

挿し穂から 2 週間後には 16 の異なる光質条件を 6 回に分けて栽培をおこなった (表 1)。光源には 3 枚の LED (ISL-305X302-RFGB, ISL-305X302-H4RFGB, ISL-150X150-FR, CCS Inc., Kyoto, Japan), FL (100MHF142DR, Monocoqtex, Inc. Tokyo, Japan) を用い光合成光量子束密度 photosynthetic photon flux density (PPF) は  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  に

設定した。LED は R, B, FR がそれぞれ独立して光強度が変更できるものを利用した。

表 1 光質実験の試験区

Light treatment	PPF ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Peak wave length (nm)	Far-red ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	B/R ratio	R/FR ratio	Pfr/Ptotal	
FL	120	-	4.55	0.94	7.54	0.83	
Red	120	660	0.27	-	449	0.89	
R/FR	7.60	120	660, 730	15.9	-	7.60	0.86
	3.90	120	660, 730	30.6	-	3.90	0.83
	1.95	120	660, 730	61.7	-	1.95	0.78
	1.22	120	660, 730	98.9	-	1.22	0.73
	0.16	120	660, 730	751	-	0.16	0.35
B/R	0.12	120	470, 660	-	0.12	-	-
	0.25	120	470, 660	-	0.25	-	-
	0.42	120	470, 660	-	0.42	-	-
	0.67	120	470, 660	-	0.67	-	-
	1.00	120	470, 660	-	1.00	-	-
8.57	120	470, 660	-	8.57	-	-	
Blue	120	470	-	-	-	-	
	120	470	-	-	-	-	
BRFR mix	B60 R60 FR60	120	470, 660, 730	61.1	0.98	0.98	0.69
	B88 R32 FR505	120	470, 660, 730	505	2.61	0.06	0.21

各試験区は、常に茎頂部分が  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  になるよう栽培槽をラボジャッキで上下させることで調節した。本実験で R/FR 7.60 条件区を設定したのは、使用した FL の R/FR 比が 7.54 であったため、その近似値を設定した。R/FR 1.22 条件区に関しては、Smith (1982) の報告で、日中の太陽光は R/FR 比が 1.05-1.25 であるので、同程度の R/FR 条件の観察を行うことを目的として設定した。PPF は光量子計を用いて (LI-250A, LI-COR, Inc., USA) 測定し、FR を含む区画では放射照度計 (LI-1800, LI-COR, Inc., USA) を用いて茎頂の部分が各 R/FR 条件区の設定値になるように FR の光強度を調節した。R/FR 条件区の Pfr/Ptotal 値は、Sager ら (1988) の数値を参考に算出した。

### ③光強度・日長条件に関する実験の設定

光強度・日長実験には蛍光灯 (FDA21093A, Panasonic Corporation, Kadoma, Japan), NI, EOD 処理には 660 nm 赤色 (LXM3-PD01, Lumileds Holding B.V. CA, USA), 730 nm 遠赤色光 (PR2N-3LEE-SD, ProLight Opto Technology Corporation., Taoyuan, Taiwan) LEDs を蛍光灯の間に設置した。実験区は異なる 18 種類の光強度, 日長, NI, EOD 条件に設定した。光強度実験以外は茎頂部分が常に  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  になるよう適宜動かし設定した。光強度実験に関しては設定 PPF 値が茎頂部分になるよう適宜ラボジャッキを動かした (図 1)。

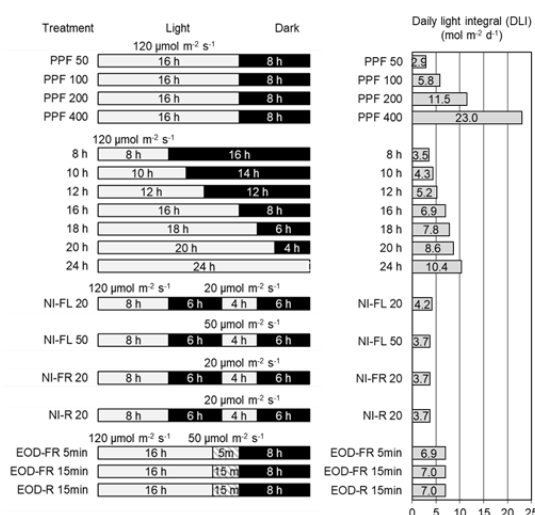


図 1 光強度・日長条件に関する光条件

## 4. 研究成果

### ①光質に対するステビアの反応

一般的な植物では R と FR の割合でフィトクロム, GA 生合成への影響が知られているため R/FR の比率を変えた環境で栽培を行った (Figs. 4-5 and 4-6). Red 区画と FR を含んだ区画では, R 区画で葉面積が最も大きくなった。R/FR 条件では, FR を多く含ませる区画ほど茎が伸び (Fig. 4-5), 総葉面積, 総葉重量, 葉枚数が小さくなっていった (Fig. 4-6). 葉の色も FR が多くなると黄緑色の薄い色素を示した。茎長に関しては, FR を多く含むほど徒長していくが, R/FR 1.95 と R/FR 1.22 条件区で R 条件区と同程度になり, R/FR 0.16 条件区で  $16.3 \text{ cm} \pm 0.9$  と最大の茎長となった。R/FR 比は赤色光受容体であるフィトクロムを介して GA 生合成量に影響を与えることが知られている。自然界において FR が多い環境は, 群落の下位の部分になる。植物群落レベルで見ると, 光合成に必要な青と R は上位の部分の葉が吸収されてしまい, 下位の葉は FR を多く含んだ光が少ない環境となる。R/FR 比は FR を多く含むと減少し, 植物は R/FR 比が小さい環境では避陰反応を起こす。避陰反応の主な形態変化は茎の徒長や葉面積の減少, クロロフィルの減少などが挙げられる (Smith, 1982). 本実験においても FL に比べると R/FR が最も小さい R/FR 0.16 条件区は有意に茎長が伸長し, 葉面積は小さく, 葉の色も薄い緑色になった。GA は植物の伸長や発芽に関わる植物ホルモンのひとつで, 避陰反応時の茎の伸長には GA の生合成量が上昇したと考えられる (Vandenbussche et al., 2005). 実際にこれまでの研究において, 伸長反応に活性型 GA のレベルが上昇することが報告されている (Beall et al., 1996). Sager ら (1986) の研究によると, Pfr/Ptotal 値が 0.35 付近の環境は FR が多い環境とされ, 本実験において茎長が最も上昇した R/FR 0.16 条件区は Pfr/Ptotal 値が 0.35

であった。つまり、本実験の R/FR 0.16 条件区は、自然界において日陰に相当する光環境下であった。そのため避陰反応として R/FR 0.16 条件区のスチビアは、葉の生長を抑えても下層の群落から抜け出そうと茎を伸ばし、結果、本実験において最大の茎長になり、1 植物あたりの総葉面積が減少したと考えられる。

FL 条件区は R/FR 7.60 条件区と同じ R/FR 比にもかかわらず、総葉面積、総葉重量が R/FR 7.60 の条件区で小さくなった。これらの変化は挿し穂後 4、6 週目共に同様の傾向を示した。茎長に関しては R と比較して 4 週目では最大 5.6 cm、6 週目では最大 3.8 cm の差となり 4 週目の方が顕著な差となった。通常、FL は R、FR 以外にも青色といった他の光質も含み、本実験で使用した FL も B を多く含んでいる。つまり、R/FR 比が近似しているにもかかわらず、葉の形態に差が出たのは R、FR 以外の光質が関わっている可能性が考えられる。また、この結果と似た傾向を示す報告がレタスで存在する。Kim ら (2004) は、レタスを広帯域波長の光に曝すと葉面積が増加すると報告している。これらの結果より、FL 条件区は R/FR 7.60 条件区よりも広帯域波長をカバーしており、このことが葉の形態に影響を与えたと予想される。

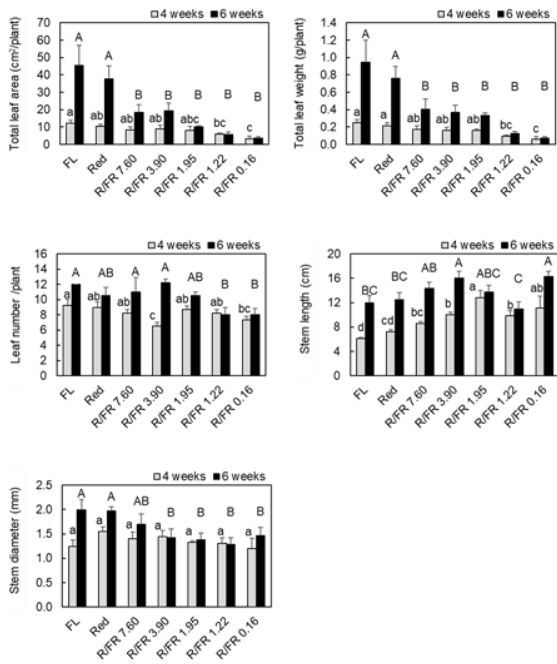


図2 R / FR 処理における 4 または 6 週齢の形態分析

また、遺伝子解析に関しては、*KO* の発現量の場合、FL 条件区と比較すると R/FR 1.22 において有意に発現量が上昇した (図3)。既往の研究により、フィトクロムが茎を伸ばさせる GA 制御に関わる可能性があることが示唆されている。今回、R/FR 比が小さい区画 (R/FR 1.22 と 0.16) で SGs と GA 生合成で共

通部分の遺伝子である *KO* の発現量が上昇していることから、低い R/FR 比の光環境によって GA 生合成のシグナルが上方制御されたと考えられる。今回、設定した R/FR 1.22 条件区の Pfr/Ptotal 値は 0.73 で (Table 1)、Smith ら (1982) のデータによると Pfr/Ptotal = 0.73 付近は、自然界において日中の光環境となる。つまり、通常の植物では R/FR 1.22 条件区では避陰反応は起こらないと予想される。しかしながら、彼らは同時に植物種ごとに茎を伸ばさせる避陰反応とフィトクロムの関係は異なることも報告している。スチビアの場合、R/FR 1.22 の条件から GA 生合成に関わる *KO* の遺伝子発現量が増加していることから、この R/FR 条件で避陰反応が起こり、GA 生合成が促されている可能性がある。

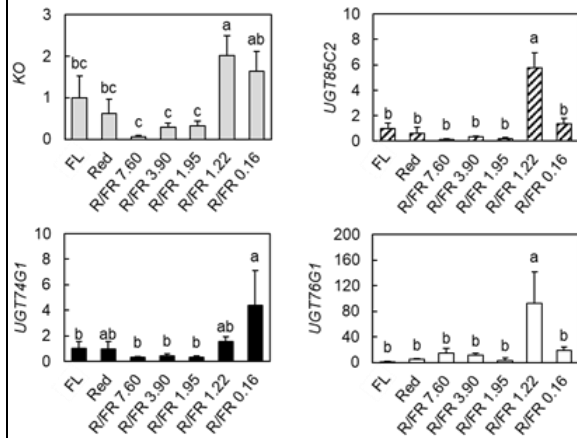


図3 R / FR 処理における 6 週齢の相対転写レベル

## ② 光強度・日長条件に対する反応

形態的特徴量を図4に示す。全ての測定項目は、挿し穂から 4、6 週間後の双方共に、光強度が強くなるほど高くなる傾向を示し、特に挿し穂から 6 週間後の PPF 400 条件区において、1 植物体あたりの総葉面積 (72.3 cm<sup>2</sup> ± 14.4)、総葉生体重量 (2.3 g ± 0.3)、葉数 (14.5 枚 ± 1.1)、茎長 (189.5 mm ± 13.7)、茎径 (3.8 mm ± 0.6) が最大となり挿し穂から 4 週間後の結果よりも顕著となった。これは PPF が強くなるほど、光合成が盛んになり成長したと考えられる。また、挿し穂から 4 週間後よりも 6 週間後の方が各試験区の差が顕著に現れたのは、挿し穂から 4 週間後はまだ栄養成長期の初期の段階であり、異なる PPF 条件に移してから 2 週間しかたっており、形態変化としての表現を示すには 2 週間という時間はスチビアにとって早かったからと考えられる。Ceunen と Geuns (2013) は、スチビアを長日と短日条件におき、SGs 量の測定を行ったが、成長のステージによって差の大きさが異なる事を報告している。彼らは花成分化の直前である、栄養成長後期の

方が、早期の栄養成長期よりも、長日と短日条件による SGs 量の差が顕著に現れている結果を示した。これらの結果からも、本実験において挿し穂から 4 週間後の各試験区の形態の差が大きくならなかつたのは成長ステージが早期であったためと予想できる。

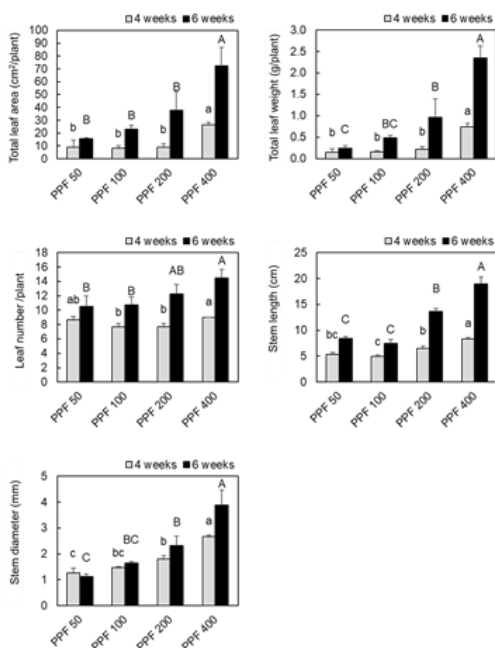


図 4 異なる光強度における 4 または 6 週齢の形態の比較

遺伝子解析に関しては、*KO*, *UGT85C2*, *UGT74G1* の SGs 関連遺伝子の発現量はどの PPF 試験区間でも有意な差は得られなかつた (図 5)。唯一、PPF 100 条件区において *UGT76G1* の発現量が他の PPF 条件区と比較して有意に上昇していた。PPF 50 条件区と比べると PPF 100 条件区の *UGT76G1* 発現量は約 4.9 倍増加していた。これらの結果により、光強度による SGs 関連遺伝子の発現量への影響がない可能性が示唆された。Kumar ら (2013) は、光環境を暗くしても SGs 量の有意な変化が起こらなかつたと報告している。彼らの実験は露地であり、本研究はグロースチャンパーと栽培環境は違い、さらに SGs 関連遺伝子の発現量という間接的な SGs 量の推定解析であるが、傾向は類似していた。*UGT76G1* の PPF 100 条件区において有意に発現量が上昇を示したが、これまでの第 3, 4 章の実験や既往の研究でステビアの SGs 量の間接的な解析には *UGT85C2* の発現量がより相関性がある可能性が示されているため、単純に PPF 100 条件区が SGs 量の向上に最適な光環境であると結論づけるにはさらなる研究が必要であると考えられる。

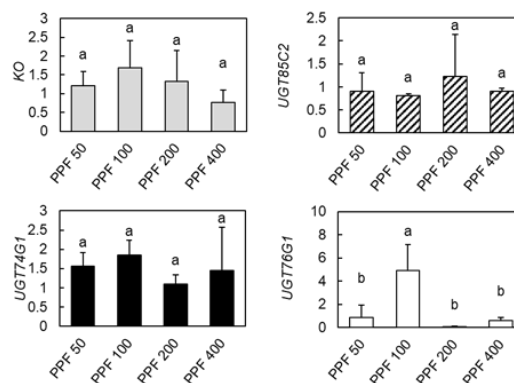


図 5 異なる光強度を受けた 6 週齢の相対転写レベル

## 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 3 件)

① Yuki Yoneda, Hiroshi Shimizu, Hiroshi Nakashima, Juro Miyasaka, Katsuaki Ohdoi, Effect of Treatment with Gibberellin, Gibberellin Biosynthesis Inhibitor, and Auxin on Steviol Glycoside Content in *Stevia rebaudiana* Bertoni, Sugar Tech, 査読有, 2017, Online First Articles SSN: 0972-1525 (Print) 0974-0740 (Online) <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0561-34245711353828>.

② Yuki Yoneda, Hiroshi Shimizu, Hiroshi Nakashima, Juro Miyasaka, Katsuaki Ohdoi, Impact of blue, red, and far-red light treatments on gene expression and steviol glycoside accumulation in *Stevia rebaudiana*, Phytochemistry, 査読有, Vol.137, 2017, 57-65

③ Yuki Yoneda, Hiroshi Shimizu, Hiroshi Nakashima, Juro Miyasaka, Katsuaki Ohdoi, Effects of light intensity and photoperiod on improving steviol glycosides content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni while conserving light energy consumption, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 査読有, Vol.7, 2017, 64-73

[学会発表] (計 4 件)

[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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 浩 (SHIMIZU, Hiroshi)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50206207

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし