

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450035

研究課題名(和文) アスパラガスにおけるルチン生合成系の光環境応答機構の解明

研究課題名(英文) Study on the response-mechanisms of the rutin biosynthetic pathway of asparagus in relation to the light intensity during cultivation

研究代表者

前田 智雄 (Maeda, Tomoo)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90530478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アスパラガス冬季伏せ込み栽培における栽培中の光環境制御がルチンの生合成に及ぼす影響を検討するため、光環境を変えて栽培した若茎からRNAを抽出して得たcDNAについて、ルチン生合成系の遺伝子のクローニングおよび発現解析を行った。その結果、配糖化酵素以外のすべての遺伝子についてリアルタイムPCR条件が確定できた。また、遺伝子発現解析を行った結果、グリーン(ルチン含有)とホワイト(ルチンなし)とで、FLS遺伝子の発現量にきわめて大きな差異があることを見いだした。またフラボノイド配糖化酵素についてはGTおよびRT遺伝子の部分配列を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of investigating the effects of the light condition on rutin biosynthesis of asparagus cultivated by winter 'Fusekomi' forcing culture, determination of rutin contents and gene expressing analysis were conducted using a real time PCR technique. No rutin was found in white spears while it was found in green spears, and the contents got higher in relation to the light intensity during cultivation. The bands of gene fragments of all the genes except glucosyl and rhamnosyl transferases (GT and RT) are identified using RT-PCR. Gene expression analysis of CHS, CHI, F3H, F3'H and FLS genes were successfully conducted using Actin gene as the reference control. A clear, large difference was observed in FLS gene between green and white asparagus spears, suggesting that FLS was the key enzyme responding to the light condition in asparagus spears. And finally, sequences of partial fragment of GT and RT were successfully identified.

研究分野：蔬菜園芸学

キーワード：アスパラガス ルチン フラボノイド 光環境制御 リアルタイムPCR 遺伝子発現解析 クローニング  
配糖化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

アスパラガス(*Asparagus officinalis* L.)の若茎にはビタミンやミネラルが豊富に含まれるほか(元木ら、2003)、生理活性を示す機能性成分として、グリーンアスパラガスとムラサキアスパラガスはフラボノイド化合物のルチン(Rutin)、ホワイトアスパラガスはサポニン化合物の一種であるプロトディオシン(Protodioscin)を含んでいる。ルチンは抗酸化活性が高く、高血圧予防作用を示すことが知られている。プロトディオシンは苦味成分で、抗腫瘍作用が報告されている(Wangら、2003)。このように、アスパラガスは近年、さまざまな機能性成分を含む健康野菜として認識されるようになってきている(元木ら2003、Maedaら、2005)。これらの成分は栽培環境によってその含量が大きく変動することも明らかになっている(Maedaら、2008、2010)。

アスパラガスは基本的に露地栽培、ハウス半促成栽培および伏せ込み促成栽培の3つの方法により栽培される。このうち、露地栽培と半促成栽培は、春どり、夏秋どりおよび春から秋にかけての長期どりが行われる。一方、伏せ込み促成栽培は冬季に収穫が行われる。日本では露地栽培と半促成栽培による4月～10月にかけての生産が多く、11月～3月の冬季の生産量は少ない。このため、近年この時期の生産を可能とする伏せ込み促成栽培が注目されている。

伏せ込み促成栽培は、圃場で春から秋にかけて定植 - 養成した株を、11月に圃場から掘り上げ、ビニールハウス内に設置した栽培床に伏せ込み、加温して収穫を行う方法である。手間はかかるが、端境期に出荷できることから最近普及が拡大している。伏せ込み促成栽培は、グリーンアスパラガスが主であるが、冬季間、2～3重に被覆されたハウスでの栽培となるため、若茎の色が淡く、そして機能性成分であるルチン含量も少ないという問題がある(前田、未発表データ)。一方で、比較的面積の狭いハウスの栽培床に株をびっしりと密植し、温床線や温湯管で加温を行い、さらに暖房機器も使用した環境制

御が普及している。研究代表者らは、アスパラガスのルチン含量が光環境の影響で増減しており、光環境を改善することで含量が増加することを報告している(Maedaら、2010)。そこで、伏せ込み促成栽培ハウスが環境条件を制御しやすい栽培方法に着目し、若茎の着色や、含まれる機能性成分含量の向上を目的として、光環境の制御技術について検討を行うこととした。

光環境制御により、着色や機能性成分の含量を人為的に制御することが可能となれば、国産アスパラガスにこれまでにない付加価値を付与することになる。

一方、フラボノイド化合物やサポニン化合物は植物界に広く分布する物質で、その構造から生合成に関わる遺伝子群は明らかになっているが、アスパラガスに関しては、フラボノイド、サポニンのいずれの生合成に関わる酵素遺伝子の単離は行われておらず、これらの化合物の生合成がどのようなメカニズムで制御されているのかはこれまでほとんど明らかになっていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

アスパラガスはフラボノイドなどの生理活性物質を豊富に含み、健康野菜として近年注目されている。研究代表者らのこれまでの研究で、栽培環境、特に光環境を制御することで、アスパラガスに含まれる主要フラボノイド化合物のルチン(Quercetin-3-O-rutinoside)の含有量を人為的に変動させることが可能となった。そこで本研究では、アスパラガスのルチン生合成経路におけるKey enzyme 遺伝子の単離・同定を行い、さらに遮光、弱光、補光による強光などの光環境を制御した条件でアスパラガスを栽培して、各遺伝子の発現解析を行い、ルチン生合成系の栽培環境、特に光に対する応答の機構を分子生物学的に明らかにし、より優れた栽培環境制御技術開発に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

弘前大学学内圃場のビニールハウスでアスパラガスの冬季伏せ込み促成栽培(グリーン、ホワイト)を光環境制御条件下で行い、グリーンおよびホワイトの若茎を収穫した。試験区は、遮光率が99.99%を超える遮光フィルムを用いた遮光栽培(ホワイトアスパラ)、グリーンの弱光条件(遮光率50%程度のネットで遮光)、無処理(対照区)、補光区(白色蛍光灯を用いて夜間補光)を設定して栽培した。それぞれの試験区で栽培した。収穫した若茎の頂部(1/3)に含まれるルチン含量および基部(1/3)に含まれるプロトディオシン含量を、HPLCを用いて分析した。

一方、各条件で栽培・収穫した若茎の表皮組織からRNAを抽出し、逆転写してcDNAを得た。このcDNAをテンプレートに、ルチン生合成あるいはフラボノイド生合成経路にかかわる酵素であるカルコンシンターゼ(CHS)、カルコンイソメラーゼ(CHI)、フラバノン3-ヒドロキシラーゼ(F3H)、フラボノイド3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)、フラボノールシンターゼ(FLS)について、リアルタイムPCRを用いてActin遺伝子を対照遺伝子として発現解析を行った。さらに、Race法を用いて各遺伝子のクローニングを行った。さらに、近縁植物にも報告がない、プロトディオシンの生合成に関わる重要な酵素であると思われるサポニン配糖化酵素については、双子葉植物での報告例(Koharaら、2xxx)を参考にしてプライマーを設計し、部分配列を得ようと試みた。

### 4. 研究成果

#### a. ルチン含量に及ぼす光環境制御の影響

ホワイト栽培、無補光の対照区、白色蛍光灯による補光処理区のそれぞれのルチン含量は、ホワイトでは未検出、無補光区では1~2 mg/g DW、補光区では約2.5 mg/g DWを示し、照射光量が高いほどルチン含量がTukey法による多重検定により5%水準で有意に増加する傾向が認められた(Fig.1)。

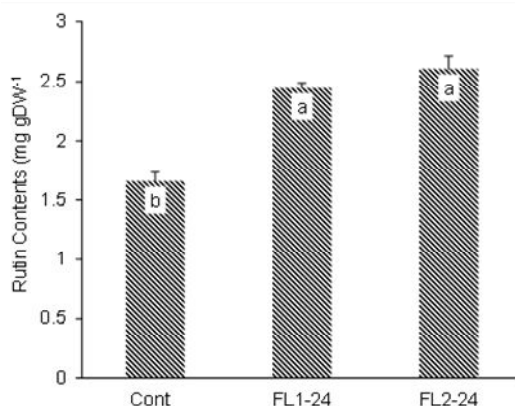


Fig. 1. 補光に用いた蛍光灯の本数とルチン含量の関係

また、若茎の色調は、緑色が濃くなり、色差計による色調も有意に緑色が濃くなる結果を示した(データ省略)。補光処理が外観品質の良化につながることを示された。

#### b. アスパラガスのフラボノイド生合成に関わる遺伝子発現

近縁の種の塩基配列情報をもとにプライマーを設計した結果(Table 1)、アスパラガスの表皮組織から得られたcDNAにおいて、フラボノイド生合成に関わる遺伝子であるCHS、CHI、F3H、F3'HそしてFLSの発現が、グリーン若茎と、ルチンを含まないホワイト若茎のいずれにおいても確認された。

Table 1. 使用したプライマー

Primer	Sequence (5'→3')
AoActin-F1	ATGGGGGCAGAAGGATGCCCTATG
AoActin-R2	CCACATCTGTTGGAATGTGCT
AoCHS-realF	TGTACCAGCAAGGCTGCTTCG
AoCHS-realR	CTGAATGTGATCCTCACACCG
AoCHI-rt-Fd1	AAGGGGAAGGATGCTGAGGAG
AoCHI-rt-Rv1	TAGGTTCCGATGGCTTTCCAG
AoF3H-rt-Fd1	CTTCAGGGTGAAGCAGTGCAA
AoF3H-rt-Rv1	CATGGCCTCGGAGAGAACCAC
AoFLS-rt-Fd2	CTCACACCAGGTGAGCTCG
AoFLS-rt-Rv2	CTGGGGAGCGATCAAACAATG

生合成経路の上流に当たるCHSの発現量はグリーンでやや高く、CHIではホワイトアスの発現量がやや高かった(データ省略)。グリーンアスパラガスにおけるF3Hではグリーンとホワイトに発

現量の明瞭な差は見られなかった。

一方、F3'Hおよびルチンのアグリコンであるケルセチン合成の最下流にあたるFLSにおいて、ホワイトでの発現量がきわめて少なく、グリーンでの発現量多いことが確認された (Fig.2)。以上の結果から、アスパラガスのルチン含量の多寡には、生合成経路の下流の反応を触媒するFLSの発現量が関わっている可能性が高いと考えられた。現在、引き続き、異なる時期の試料を用いて確認を進めている。また、今後は光環境にตอบสนองする転写因子の影響についても検討を進める予定である。

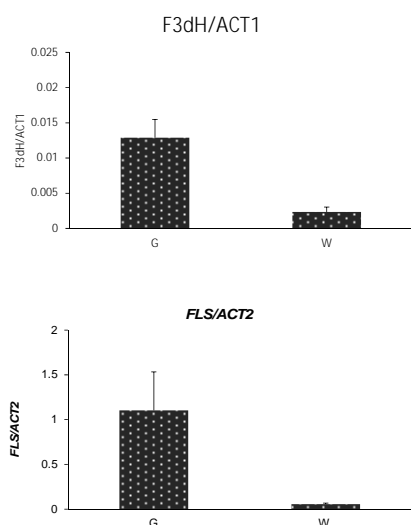


Fig.2. Realtime PCRによるグリーンおよびホワイト若茎表皮組織におけるF3'HおよびFLSの発現量の差

#### d. アスパラガスのフラボノイド生合成に関わる遺伝子の単離およびクローニング

上流の遺伝子であるCHSの全長を得るために、クローニングを行っている最中である。一方、最下流である配糖化酵素のGTとRTのクローニングを試みているが、これまでに単子葉植物において同定された例が少なく、適切なプライマーの設計に苦労していたが、ようやくGTの部分配列のクローニングができた。今後はさらに最上流のCHS、最下流の配糖化酵素、FLSと順次クローニングとシーケンスを行っていく予定である。

#### <引用文献>

1. 元木悟. 2003. アスパラガスの作業便利帳.

農文協.

2. Wang, M. ら . 2005. Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. J. Agric. Food Chem. 51: 6132–6136.
3. Maeda, T. ら. 2005. Antioxidation capacities of extracts from green, purple, and white asparagus spears related to polyphenol concentration. HortScience. 40: 1221–1224.
4. Maeda, T. ら . 2010. Light Condition Influences Rutin and Polyphenol Contents in Asparagus Spears in the Mother-fern Culture System during the Summer–Autumn Harvest. JJS. 79: 161–167.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Wambrauw, D.Z.K., T. Maeda, et al. 2016. Effect of supplemental light on the quality of green Asparagus Spears in winter 'Fusekomi' forcing culture. Environmental Control in Biology (accepted).

[学会発表] (計 2 件)

1. Wambrauw, D.Z.K., T. Maeda, et al. Effect of supplemental light on the quality of green asparagus cultivated by winter forcing culture. 21, Sept. 2013. 園芸学会秋季大会.
2. Wambrauw, D.Z.K., T. Maeda, et al. Effect of supplemental light on the quality of green asparagus cultivated by winter 'Fusekomi' forcing culture. 18, Oct. 2013. 13th International asparagus symposium. Nan-Chang, Jiangxi, China.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 智雄(Maeda, Tomoo)

弘前大学農学生命科学部 准教授

研究者番号:90530478

(2)研究分担者

志村 華子(Shimura, Hanako)

北海道大学大学院 農学研究科 助教

研究者番号: 20507230