

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：86103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850161

研究課題名(和文)ホウレンソウ光害における開花遺伝子発現を用いた効率的評価法の開発

研究課題名(英文)Development of efficient evaluation methods using florigen gene expression in light pollution of spinach

研究代表者

原田 陽子(HARADA, Yoko)

徳島県立農林水産総合技術支援センター(試験研究部)・徳島県立農林水産総合技術支援センター(農産園芸研究課)・研究員

研究者番号：40726254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：屋外照明は、夜間の社会・経済活動における安心・安全な光環境を確保する重要なインフラの一つであるが、その一方で、光害(ひかりがい)の原因となり得る。特に、農産物の被害では減収をまねくこともあり、ホウレンソウでは開花(抽)促進を起し、商品価値を低下させる。ホウレンソウ光害では、晩生品種を栽培することにより被害軽減をしているものの、品種改良が盛んなホウレンソウにおいて、その中から光害に有効な品種を選択することは、非効率である。それゆえ、短期間に多品種を比較可能な手法として、開花誘導遺伝子の発現を用いた評価法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Exterior illumination in populated areas is part of the basic infrastructure used to secure relief from darkness and safety for social and economic activity at night. Yet at the same time, it can also be a source of light pollution ("HIKARI-GAI" in Japanese). In particular, agricultural products can be harmed, sometimes leading to yield decline. Spinach flowers early (bolting), reducing its commercial value. In regard to spinach, we implement measures to reduce the damage by cultivating varieties of late bolting. However, for varieties of spinach that breed one after another, the conventional method for selecting effective varieties for light pollution is inefficient. Therefore, we tried to develop more efficient evaluation methods, which is possible through a comparison of a wide variety for light pollution in a short period. To do so, it was confirmed florigen gene.

研究分野：農業環境・情報工学

キーワード：植物 ホウレンソウ 光害 開花遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

夜間の安全に必要な照明の漏れ光が農地に照射されると、農作物の減収や価値喪失などの悪影響を与える光害(ひかりがい)が発生する。さらに現在は、農地の宅地への転換が増加し、これまで以上に光害の発生は増加すると考えられる。それに対し、近郊農業野菜で光害被害の報告が多いハウレンソウでは、屋外照明の漏れ光の照射を受けた場合でも、被害が小さい品種を栽培する等の対策が行われている。しかし、光害対策に有効な品種の選定は、栽培試験の結果を用いるため、膨大な品種の中から選択するには非効率である。そこで、多品種の比較に必要な試験期間を短縮させ、効率的なハウレンソウ光害の評価技術が必要とされている。

### 2. 研究の目的

本研究では、ハウレンソウ開花誘導遺伝子発現を指標として用いることで、多品種の比較に必要な試験期間を短縮させ、効率的なハウレンソウ光害の評価手法の確立を行った。

はじめに「ハウレンソウの開花誘導遺伝子発現に対して、光害の影響評価に適したサンプリング手法および暗期照射方法の確立」として、遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて定量し、サンプリング時期・時間・部位の変化と遺伝子発現の関係について調査した。また、遺伝子発現に影響が現れるのに要する照射時間および期間を解明した。

次に、多段階な光害発生状態を再現した上で、「遺伝子発現と光害による品質低下の程度(抽苔率、花茎長)との相関関係を解明」し指標を作成した。

最終的に、人工気象器にて多品種を光害発生状態で栽培し、遺伝子発現を定量することで、「遺伝子発現を指標とし、多品種の比較を効率的に行う評価手法の確立」を行った。品種は、交配、抽苔性、早晚性の違いから選択し、指標から推測される被害の大きさで評価した。

### 3. 研究の方法

(1)ハウレンソウの開花誘導遺伝子発現に対して、光害の影響評価に適したサンプリング手法および暗期照射方法の確立

まず、ハウレンソウの開花誘導遺伝子の探索およびリアルタイム PCR に必要なプライマ設計を行った。DDBJ(DNA Data Bank of Japan)にて、ターゲット遺伝子として開花誘導遺伝子、およびハウスキーピング遺伝子としてアクチンを検索した後、プライマ設計ソフト(Primer3Plus)を用いて設計、その後同一性確認を行った。設計したプライマは、指標としての精度を確認するため、短日条件下(人工気象器(株)日本医化器械製作所製 LPH-350SP で 16 一定、明期 10 時間、約  $380 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ )で栽培したハウレンソウ 6 品種(パレード、トリトン、強力オーライ、おかめ、アトラス、アクティブ)を展開葉数 6

の時にサンプリングし、リアルタイム PCR 法にて遺伝子発現を確認した。葉の採取するタイミングは、Pierre A. Pin らのアカザ科テンサイの試験を参照<sup>1)</sup>に、ターゲット遺伝子の発現が最大となる明期開始後 6 時間後とした。採取した葉は、液体窒素で凍結させた後、凍結破砕装置(株)トッケン製、TK-AM5)で凍結破砕し、RNA の抽出を行った(RNeasy Plant Mini Kit(株)QIAGEN 社製)を用い、QIACube(株)QIAGEN 社製)にて自動処理した。cDNA の合成には、QuantiTect Rev. Transcription Kit(株)QIAGEN 社製)を用いた。合成した cDNA、遺伝子特異プライマーセットおよび Rotor-Gene SYBR Green(株)QIAGEN 社製)を用い、QIAGility(株)QIAGEN 社製)にて自動分注した。PCR 反応、蛍光検出および定量解析は、Rotor-Gene Q(株)QIAGEN 社製)を用いた。定量解析は、開花誘導遺伝子(*FLOWERING LOCUS T 2*, *FT2*)とアクチン遺伝子(*actin*)との存在比で求めた。

$$FT2/actin = FT2 \text{ 発現} \div actin \text{ 発現}$$

次に、上記と同様の方法で生育させた品種アクティブを用いて、短日条件下と数日長日条件下(赤色 LED、暗期に 5lx 照射)にて栽培した場合の遺伝子発現 *FT2/actin* を比較した。ハウレンソウ光害への影響としては、長波長側の光照射ほど抽苔率が高いと報告<sup>2)</sup>されているため、赤色 LED を使用した。

(2) 遺伝子発現と光害による品質低下の程度(抽苔率、花茎長)との相関関係を解明

3(1)の方法にて、ハウレンソウ 5 品種(アクティブ、次郎丸、強力オーライ、日本、プリウスセブン)を栽培した。対照区は、全期間短日条件下、照射区は、本葉展開時より赤色 LED を 6lx にて暗期照射した。展開葉数 6 の時に葉をサンプリングし、遺伝子発現を確認した後、引き続き生育させ花芽確認をした。ただし、対照区は播種後 100 日以上たっても花芽を確認できない株、開花調査を行わなかった品種もあったため、その品種の照射区で花芽確認された時の葉数を目安とし、葉数到達期も確認した。

### 4. 研究成果

#### (1)プライマ設計

ハウレンソウの開花誘導遺伝子については、Pierre A. Pin らの論文<sup>1)</sup>から *FT2* 遺伝子(HQ148124)をターゲットとした。アクチン遺伝子については、JN987183 から設計した。

#### *FT2*

Primer\_1\_F cgacaattgggaaggcaaac

Primer\_1\_R gacagcagcaacgggtaaac

#### *actin*

Primer\_1\_F ctgagcgcggttattctttc

Primer\_1\_R tctcagctccgattgtgatg

図 1 には、短日条件下で栽培したハウレ

ソウ6品種の遺伝子発現  $FT2/actin$  の結果を示した。全ての品種で、播種後日数 52 でサンプリングしたにも関わらず、差が生じた。これは、品種毎に遺伝子発現にばらつきがあり、指標として使用する際には、暗期照射の影響のみを測定するのではなく、短日条件という定常状態での値を基準とした評価の必要性が示唆された。

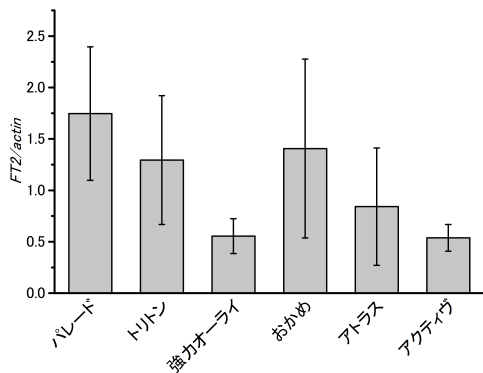


図1 短日条件下での遺伝子発現の品種比較

次に、アクティブを短日条件下で栽培した後、暗期1回、暗期2回の長日条件下と、本葉展開時から暗期照射をし続けた(暗期21回)場合との遺伝子発現の比較結果を図2に示した。暗期1回では、暗期照射なしと有意差はなかったが、暗期2回の照射では、約100倍の発現へと激増し、それは、連続照射と比較しても同様に顕著な増加であった。よって、暗期照射の影響を遺伝子発現で確認する際は、最低でも暗期2回の照射が必要であると判断できた。

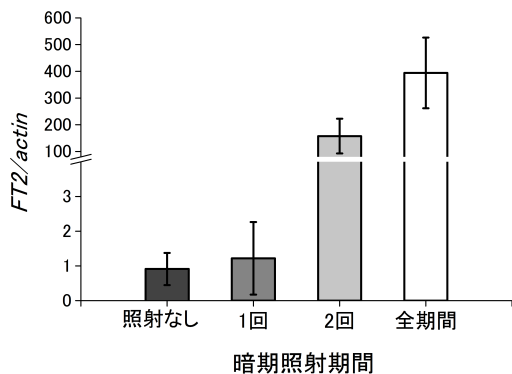


図2 暗期照射期間の違いが遺伝子発現に及ぼす影響

以上のことから、遺伝子発現による暗期照射の影響評価は可能であると考えた。遺伝子発現を確認するために必要なサンプル量は極わずかに(凍結粉末サンプル 50mg)であるが、1個体のデータ誤差を考えると、複数個体を栽培することが望ましく、特に品種によりその誤差にも差があった。これは、現段階で解明されているハウレンソウの開花誘導遺伝子が1つしかなく、今後遺伝子解析の進展によりプライマ設計精度が向上することで、解

消されるものと考えられる。さらに、暗期照射を2回行うことで顕著な差が表れるため、栽培試験と比較して、光照射の影響評価を段階に短縮可能となった。

(2) 遺伝子発現と花芽確認期の関係

図3には、ハウレンソウ品種比較試験の生育中の様子を示した。照射区の暗期照射は、播種後日数18から開始し、その13日後の播種後日数31で遺伝子発現確認用のサンプリングを行った。その時点で、図3中部のように、照射区の方がやや葉色が薄く、徒長気味であった。

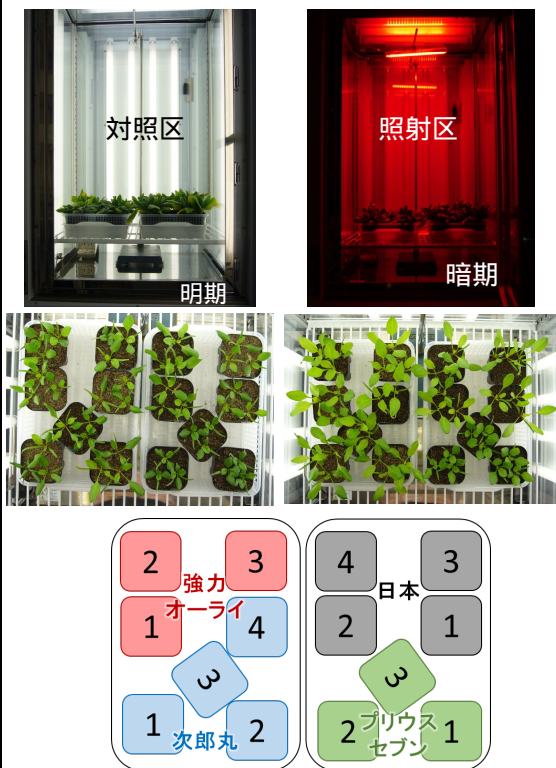


図3 人工気象器内の様子と遺伝子発現サンプリング時の生育の違い

5品種における暗期照射による遺伝子発現への影響を、図4に示した。対照区では、図1、2に示した結果と同様に、品種によって差があるものの、おおむね低く、照射区では、次郎丸で50倍、強力オーライ、日本で100倍、プリウスセブンで300倍、アクティブで500程度高くなった。

次に、遺伝子発現確認後にそのまま生育させ、花芽確認および葉数到達期を調査した結果を図5に示した。照射区の花芽確認期はプリウスセブンのみ他の4品種と比較して有意に遅かったが、他の4品種では差がなかった。対して、対照区の花芽確認期は、次郎丸、強力オーライで約80日、日本はやや早く約60日であった。プリウスセブンは、播種後日数100日以上でも花芽が確認されなかった(アクティブは調査なし)。

ここで、表1に示した品種特性をもとに考察すると、抽苔性の遅い品種であっても、照射区では開花しており、さらに、対照区の短

日条件下で後に開花した品種よりも、より多くの遺伝子発現が確認されている。つまり、晩抽苔性の品種であるアクティブが、早抽苔性の品種と同時期に開花するためには、より多くの遺伝子発現を必要とする可能性が示唆された。また、最も照射区の発現が低かったプリウスセブンは、他の4品種よりも約10日遅れて花芽確認されたことも同様の理由と考えられた。

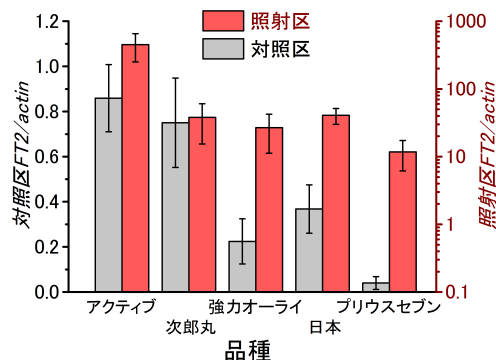
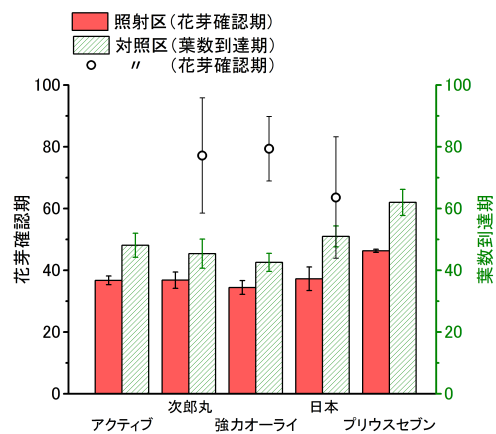


図4 5品種における暗期照射の影響



葉数到達期：その品種の照射区で花芽確認された時の葉数に達した日。アクティブは対照区の花芽確認はしていない。プリウスセブンの対照区は、100日以上でも花芽確認されず。

図5 花芽および葉数到達期の品種比較

表1 品種特性

品種名	早晩性	抽苔性	交配	栽培適期
アクティブ	中生	晩	西洋・東洋	春～夏
次郎丸	早生	早	東洋・西洋	秋
強力オーライ	早生	中	雑種・東洋	秋～春
日本	中生	早	東洋	秋
プリウスセブン	極晩生	極晩	西洋・東洋	春～夏

(3) 遺伝子発現を指標とし、多品種の比較を効率的に行う評価手法の確立

図6に、遺伝子発現と花芽確認期の関係を示した。対照区の花芽確認ができたサンプルのみで比較した。長日条件が1処理と少ないため一概には言及できないが、遺伝子発現と花芽確認期は、指数関数的な関係で表された。この関係を基に、より多くの品種を調査する

ことで、遺伝子発現による光害評価をより正確に評価可能になると示唆した。

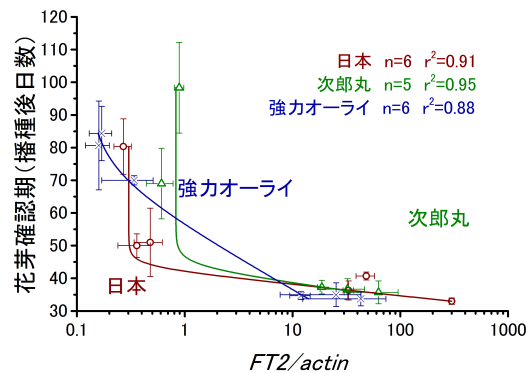


図6 遺伝子発現と花芽形成時期との関係

<引用文献>

- 1) Pierre A. Pin *et al.* Science 330、1397-1400 (2010)
- 2) 篠原晃平ら、中国・四国の農業気象 24、20-21、(2011)

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

- 原田陽子・山本晴彦・岩谷潔・山北敦子・野村和輝、イネ発育予測モデルを利用した光害発生時の出穂期予測、照明学会誌、査読有、100(6)、2016、pp.229-233
- 原田陽子・山本晴彦、農作物の光害防止における光制御、照明学会誌、査読無、98(9)、2014、pp.508-511

[学会発表](計 3件)

- Yoko Harada・Kazuki Nomura・Haruhiko Yamamoto、Development of efficient evaluation methods in light pollution of spinach、ISAM2016、2016-3-15、岡山大学(岡山県岡山市)
- Yoko Harada・Haruhiko Yamamoto・Kazuki Nomura・Kiyoshi Iwaya・Sonoyama Yoshimitsu、THE DEVELOPMENT OF LED ILLUMINATION TO REDUCE THE LIGHT POLLUTION ON CROPS、CJK2015 The 8th Lighting Conference of China、Japan and Korea、2015-8-20、京都女子大学(京都府京都市)
- 原田陽子・山本晴彦・岩谷潔・園山芳充・小林北斗、エダマメの光害評価における効率的な手法の検討、日本農業気象学会 中国・四国支部会、2014-12-5、山口大学(山口県山口市)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

- 原田 陽子 (HARADA, Yoko)  
 徳島県立農林水産総合技術支援センター・  
 農産園芸研究課・研究員  
 研究者番号：40726254