

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03105

研究課題名（和文）紫外線ストレスと光修復の組合せによる植物の生育および二次代謝物質合成の促進

研究課題名（英文）Promotion of plant growth and secondary metabolite biosynthesis by combination of UV stress and photorepair

研究代表者

彦坂 晶子（Hikosaka, Shoko）

千葉大学・大学院園芸学研究院・准教授

研究者番号：50345188

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：UV-B照射は葉菜類の機能性成分濃度を高めるが、放射束密度によっては可視障害や生育抑制を引き起こす。生育抑制の一因として、DNA損傷の1つであるシクロブタン型ピリミジン二量体（以下CPD）がDNA上に生成され、DNAの複製や転写を阻害することが挙げられる。これまでイネ以外の植物でCPDに着目した報告はなく、本研究では葉菜類（コマツナ）と薬用植物（スイカズラ）について、UVB照射によるCPDの蓄積、青色光による光修復と青色光を必要としない暗修復の効果について明らかにした。特に、UVB照射や光・暗修復によるCPDの経時変化について詳細に調査し、修復機構の応答時間などを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光修復の存在や機能についての基礎的知見は多数蓄積されており、動物細胞や昆虫では利用に関する研究も存在する。しかし、植物では主にシロイヌナズナやイネでその構造と修復機能の報告があるのみで、実用的な研究は見当たらない。本研究では、これまで基礎的知見があるものの、その応用研究が少ない「植物の光修復の機能確認と利用方法」について明らかにした点で学術的にも社会的にも意義がある。特に、UVBによる生育抑制が軽減される照射量や時間を明らかにしたことで、UVBによる収量低下を回避しながら従来よりも高品質な機能性野菜や薬用植物の生産が可能となる。また、二次代謝物質を効率的に蓄積させる技術にも応用可能である。

研究成果の概要（英文）：UV-B irradiation increases the concentration of functional compounds in leafy vegetables. However, it often causes visible damage and growth inhibition depending on the radiation flux density. One of the causes of growth inhibition is the generation of cyclobutane-type pyrimidine dimer (CPD) on DNA leading to the transcriptional inhibition. To date, there have been no reports focusing on CPD in plants other than rice. Therefore, in this experiment, we clarified the accumulation of CPD by UVB irradiation, and the effect of photorepair by blue light or dark repair without blue light on growth and CPD accumulation of komatsuna as a leafy vegetable and Japanese honeysuckle as a medicinal plant. In particular, we investigated in detail the changes in CPD over time due to UVB irradiation and light/dark repair, and clarified the response time of the repair mechanism.

研究分野：環境調節工学

キーワード：光修復 暗修復 シクロブタン型ピリミジン二量体（CPD） 青色光 紫外線（UV） フォトリアーゼ
薬用植物 人工環境下

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本をはじめ超高齢社会を迎える先進各国では、植物が生合成する多様な機能性物質や生理活性物質を利用した食品、予防医薬、治療医薬などの生産・開発が活発に行われている。これら植物の二次代謝物質は人工合成が困難なものが多く、植物による効率生産が望まれている。このような背景から、これまで温室や人工光植物工場などの人工環境下で園芸植物や薬用植物を栽培し、環境ストレス付与による機能性物質や生理活性物質の高濃度化を目指す研究が多数行われてきた。

環境ストレスのうち、紫外線 (UV) は波長や強度の制御が容易であることから研究の歴史が古く、特に UVB (280 ~ 315 nm) は二次代謝物質を高蓄積させることが多数報告されている。しかし、UV は放射束密度 (以下強度) によっては可視障害や生育抑制を引き起こす。例えば、イネ、レタス、薬用植物 (シソ、甘草、ニホンハッカなど) など多くの UV 研究では、UVB の強度や照射日数の増加に伴い、ある程度までは目的とする二次代謝物質濃度が増加するものの、同時に葉面の傷害や著しい生育抑制が生じることが報告されている。生育抑制の一因として、DNA 損傷の 1 つであるシクロブタン型ピリミジン二量体 (以下 CPD) が DNA 上に生成され、DNA の複製や転写を阻害することが挙げられる (高橋、2012)。

生物には様々な環境ストレスによって引き起こされる DNA 損傷を正常な状態に戻す修復機構が存在する。なかでも UV による DNA 損傷に対する修復機構として光修復酵素が知られ、特に青色光が有効であると報告されている。植物の光修復酵素について、これまで主にシロイヌナズナとイネでその機能や構造解明に関する基礎的研究があり、イネでは修復酵素活性の違いが UV-B 照射による生育阻害の程度を左右する (岩松、2007)。他方、園芸作物や薬用植物などの実用植物における光修復機構に関する知見はほとんどない。また、光修復の利用で UV による植物の生育抑制を軽減しつつ二次代謝物質生合成を高める研究はみあたらない。さらに、機能性成分を多く含む葉菜類では、イネとは異なり、これらの成分が植物体内に入る UV-B 量を減らし、UV-B 照射による生育阻害を軽減している可能性がある。

他方、CPD 修復機構には青色光による光修復と、青色光を必要としない暗修復がある。これまで葉菜類の CPD に着目した報告はなく、光修復と暗修復速度の違いや明期に UV-B 照射を数日行う場合の CPD 量の経時変化は明らかでない。また、これまで UV-B 照射または、青色光 (B) と赤色光 (R) の光量子束密度 (PPFD) の比 (B/R 比) が葉菜類の生育および機能性成分濃度に及ぼす影響については多数報告されているものの、UV-B 照射時に主光源の B/R 比を変化させた研究は多くない。また、B/R 比が UV-B 照射による生育抑制の軽減に及ぼす影響を調査した研究はみあたらない。

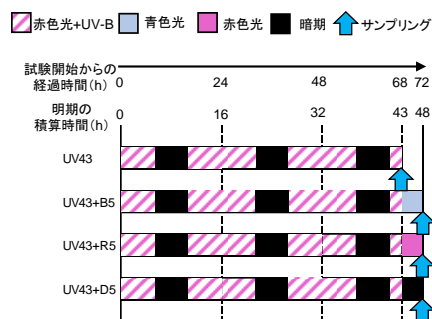
2. 研究の目的

本研究では、園芸作物や薬用植物などの実用植物における光修復機構の基礎的知見を得ることを目的とする。具体的には、葉菜類および薬用植物を対象とした光環境制御により、光修復と暗修復による CPD の経時変化を調査し、両機構の修復速度の違いを明らかにする。また、光環境制御による光修復の利用方法を開発するための基礎的知見として、青色光と赤色光の光量子束密度の比が葉菜類の生育および機能性成分濃度に及ぼす影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

シロイヌナズナと同じアブラナ科葉菜類で機能性成分濃度の高いコマツナ (*Brassica rapa* var. *perviridis*) を供試した。また、一部の試験では、多様な生理活性物質を含む薬用植物であるスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) を用いた。

【試験 1】コマツナの光修復と暗修復が CPD 量に及ぼす影響、UV-B 照射による CPD 量の経時変化を明らかにするため、コマツナを人工環境下で湛液水耕栽培した。試験は子葉から数えて第 3 葉の葉長が約 4.5 cm に達した播種後 15 日目から行い、UV-B 蛍光灯を用いて地上部に 10 W m⁻² の強度で UV-B 照射した。各試験とも第 3 葉の CPD 量を ELISA 法で測定した。

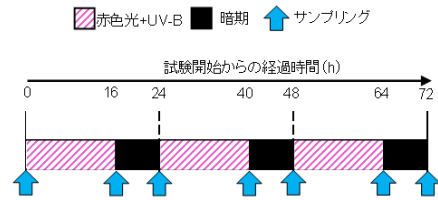


第 1 図 光照射条件【試験 1】
播種後 15 日目のコマツナを供試した。赤色光では光修復は起さない。

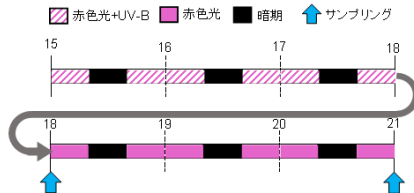
【試験 1-①】3 日間の明期、合計 43 h に光修復酵素が活性化しない赤色光と UV-B を同時照射し、CPD を蓄積させた (UV43 区)。その後 5 h に、光修復させる青色光 (UV43+B5) 区、暗修復のみの赤色光 (UV43+R5) 区と暗黒 (UV43+D5) 区を設けた (第 1 図)。

【試験 1-②】赤色光を主光源とし、3 日間の明期に UV-B を同時照射し、各日の明期と暗期の終了時の CPD 量を測定した (第 2 図)。

【試験 1-③】3 日間の明期に赤色光と UV-B を同時照射し、CPD を蓄積させ、その後 3 日間赤色光のみを照射することで、暗修復の影響を調査した (第 3 図)。

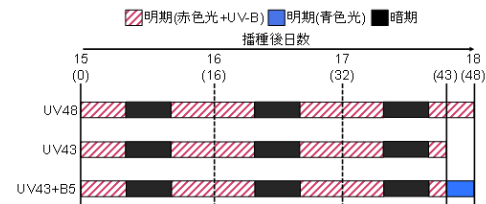


第 2 図 試験 2 の光照射条件【試験 2】
播種後 15 日目のコマツナを供試した。図中の数字は試験開始からの経過時間を示す。赤色光では光修復は起きない。



第 3 図 光照射条件【試験 3】
図中の数字は播種後日数を示す。赤色光では光修復は起きない。

【試験 2】UV-B 照射による機能性成分の高濃度化と、CPD 量の減少による生育阻害や可視障害の軽減が可能な青色光照射条件の探索を目的とし、試験 1 と同様の条件で育成したコマツナを以下の試験に用いた。また、共通の調査項目は、地上部生体重、総葉面積、比葉重、第 3 葉の葉身のアスコルビン酸 (AsA) 濃度、総ポリフェノール (TP) 濃度および CPD 量とした。



第 4 図 試験 2-②の概要。
() 内の数字は赤色光+UV-B あるいは青色光照射の積算時間 (h)。UV43 区では 43 h、他の区では 48 h でサンプリング。

【試験 2-①】UV-B と青色光の同時照射の影響を明らかにするため、試験区は明期中に UV-B 非照射で青色光を照射した B 区、赤色光を照射した R 区、青色光または赤色光に 4 または 10 $W m^{-2}$ の UV を同時照射した BUV4、RUV4 区、BUV10 区および RUV10 区とした。

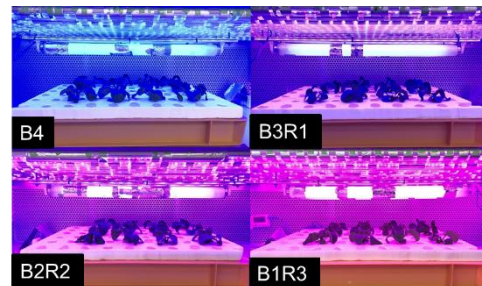


写真 1 UV-B 照射時の様子【試験 2-③】。

【試験 2-②】UV-B 照射後の青色光照射の影響を明らかにするため、修復酵素が活性化しない赤色光 (Murata and Osakabe, 2014) を UV-B と同時照射し、青色光照射前に CPD 量を増大させた。試験区は赤色光および 4 $W m^{-2}$ の UV を明期中に合計 48 h 照射した UV48 区、43 h 照射した UV43 区、43 h 照射後に青色光を 5 h 照射した UV43+B5 区とした (第 4 図)。赤色光と青色光の PPFd は 200 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ とし、他の条件は試験 2-①と同様とした。

【試験 2-③】UV-B 照射時の B/R 比が生育、機能性成分濃度および修復酵素活性の指標となる CPD 量に及ぼす影響を調査した。試験区は青色光または B/R 比を 3.0、1.0 または 0.33 とし、10 $W m^{-2}$ の UV を同時照射した B4 区、B3R1 区、B2R2 区および B1R3 区とした (写真 1)。

【試験 3】葉菜類よりも多様な二次代謝物質を含むスイカズラへの UV 照射の影響を明らかにするため、試験 1 と同じ UV 照射条件で 3~5 日間の試験を行った。スイカズラはつる性植物のため、5~7 節葉のついたつるを養液栽培のコンテナに水平に誘引し、葉位に寄らず同じ放射束の UV を照射した。照射後の外観および CPD 量を測定した (写真 2)。



写真 2 スイカズラへの UV-B 照射時の様子【試験 3】。

4. 研究成果

【試験 1】【試験 1-①】UV43 区と比べて UV43+B5 区で CPD 量が有意に減少し、UV43+R5 区および UV43+D5 区では UV43 区と差がなかった。よって、光修復速度は暗修復速度よりも高く、5 h の暗修復では CPD 量は減少しないことが明らかとなった。

【試験 1-②】光修復がない場合、CPD 量は経時的に増加した。暗期中の CPD 量は、1 日目、2 日目とも減少せず、3 日目 (64-72 h) に減少傾向がみられた。CPD 量が多いほど、暗修復酵素と CPD の反応速度が高まることで、暗修復速度が高まる報告があることから、本試験でも CPD 量がある程度蓄積した 3 日目に暗修復により CPD 量が減少した可能性が示唆された。試験 1 と試験 2

より、暗修復では、5時間の光修復ほどのCPD量の減少はみられなかった。

【試験1-③】暗修復の期間をより長く設定した結果、暗修復前と暗修復72h後のCPD量に差はなかった。よって、3日間72hの暗修復によってもCPD量は減少せず、試験2の3日目の暗期においてもCPD量は減少しなかったと結論した。

以上より、UV-B照射によるDNA損傷は、青色光を必要としない暗修復より、青色光による光修復を主な修復機構として修復されること、3日間のUV-B照射によりCPD量が経時的に増大すること、暗修復は3日後のCPD量に差がみられないほど軽微な修復機構であることが明らかとなった。

【試験2】【試験2-①】両UV強度とも、UV-B照射した2区でUV-B非照射の2区より地上部生体重、総葉面積は有意に小あるいは小の傾向、比葉重は有意に大だった。また、RUV区の比葉重はBUV区や非照射の2区より有意に大だった。UV-B照射区では上位葉の光沢や葉の萎縮といった可視障害がみられ、その程度はUV強度が高いほど、またRUV区でBUV区よりも顕著だった。一般にUV-B照射された植物では、生体重や葉面積の減少といった生育阻害に加え、UV-Bへの適応機構として、比葉重の増加や葉表面のワックス状物質の蓄積による光沢が生じる(野内, 2001)。本試験のUV-B照射区でも同様の傾向がみられ、特にRUV区で顕著だった。そのため、UV強度によらず、明期のUV-B照射時に青色光を同時照射することで、赤色光の同時照射よりも葉の肥厚や可視障害が軽減されることが示唆された。

両UV強度とも、AsA濃度はB区およびBUV区でR区およびRUV区より有意に大あるいは大の傾向、TP濃度はBUV区で他の区より有意に大となった。既往研究でも、青色光照射で赤色光照射よりコマツナのAsA濃度(Ohashi et al., 2007)や赤系リーフレタスのTP濃度(Son et al., 2017)が大となり、UV-B照射でバジル(Sakalauskaite et al., 2012)やセリ(Jeon et al., 2018)のTP濃度が大きくなったと報告されている。よって、明期のUV-B照射時に青色光を同時照射することで、赤色光照射よりもAsA濃度およびTP濃度を高められると考えられた。

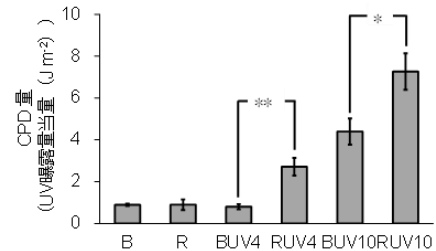
CPD量はUV強度が高いほど、かつ赤色光照射区(RUV4区、RUV10区)で青色光照射区(BUV4区、BUV10区)より大となった(第5図)。両UV強度とも、RUV区より可視障害が軽減されたBUV区でCPD量が少なかったことから、BUV区でRUV区より修復酵素活性が高かったことが示唆された。

他方、ポリフェノール類はUV-Bを吸収し、植物体内に入るUV-B量を減少させる(橋本, 2000)。よって、TP濃度がRUV区より高かったBUV区では、ポリフェノール類の蓄積によって植物体内に入るUV-B量が減少し、CPDの生成量が他の区より少なかった可能性も考えられた。以上より、明期のUV-B照射時に青色光を同時照射することで、赤色光の同時照射よりもUV-B照射による葉の肥厚や可視障害を軽減でき、さらにAsAやTPを高濃度化できることが明らかになった。また、BUV区でRUV区よりCPD量が小となった理由として、修復酵素の活性化あるいはポリフェノール類の蓄積のいずれか、または両方が考えられた。

【試験2-②】CPD量はUV43+B5区で他の区より有意に小だった(第4図)。本試験では、生育、機能性成分濃度に試験区間差がなかったことから、UV43+B5区のCPD量が小だった理由は、修復酵素の活性化が一因と示唆された。よって、TP濃度が同一の場合でも青色光照射で修復酵素が活性化し、CPD量が減少したと考えられた。このことから、試験1においても青色光照射により修復酵素が活性化していたと考えられた。

【試験2-③】UV-B照射した全区で生育阻害および可視障害がみられ、試験1のUV-B非照射区と比較して生育は小だった。地上部生体重および総葉面積は、B4区とB2R2区で同程度となり、他の2区より大の傾向となった。また、AsA濃度およびTP濃度はB2R2区で他の区より有意に大となった。可視障害の程度は、B4区およびB2R2区でB3R1区およびB1R3区より軽度だった。植物種やPFDによって、生育促進や機能性成分の高濃度化に適したB/R比は異なる(Furuyama et al., 2014; Vaštakaitė et al., 2015)ことが知られ、本試験では、B4区は生育阻害を軽減、B2R2区は生育阻害を軽減し、かつAsA濃度およびTP濃度を高めるのに適した条件だったと考えられた。

CPD量は本試験とUV強度が同じ試験1のRUV10区と比べ、全区で約40%以下となり、特にB2R2区では約14%だった。また、CPD量は青色光のPFDが最も高いB4区で、最も低い(50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) B1R3区と同程度だった。よって、本試験の範囲では、青色光のPFDを50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上とすることで、B/R比によらず、生成したCPD量を一定量に減少させるために必要な修復酵素活性が得られることが示唆された。他方、B2R2区で他の区よりCPD量が有意に小となった。B2R2区では他の区よりTP濃度が高く、ポリフェノール類の蓄積によって植物体内に入るUV-B量が減少し、CPDの生成量が減少した可能性が考えられた。よって、ポリフェノール類の蓄積に適したB/R比にすることでCPDの生成を抑制でき、生育阻害および可視障害の軽減に有効と考えられた。また、試験1および試験3の青色光照射によるCPD量の減少には、修復酵素の活性化とポリフェノール類の蓄積の両方が関与したと考えられた。



第5図 UV-B照射時の青色光照射がCPD量に及ぼす影響【試験2-①】。

*および**はt検定において5%および1%水準で試験区間に有意差あり(n=6-8)。図中のバーは標準誤差。CPD量はELISA法で測定後、UV曝露量当量として算出。

以上より、UV-B 照射時に青色光を同時照射することで、赤色光の同時照射よりも葉の肥厚や可視障害が軽減し、さらに AsA および TP の高濃度化に有効だった。また、青色光照射による CPD 量の減少には、修復酵素の活性化とポリフェノール類の蓄積の両方が関与したと考えられた。よって、UV-B 照射時に主光源の青色光の PFD を $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 以上とし、かつポリフェノール類の蓄積に適した B/R 比にすることで、コマツナの機能性成分濃度を高めつつ、CPD 量を減少させ、生育障害や可視障害を軽減できると考えられた。

【試験 3】試験後に葉の障害はみられなかった。UV 照射区の CPD は、同じ条件で照射したコマツナよりも少なかった。よって、多様な二次代謝物質を含むスイカズラでは、UV 照射の影響はコマツナよりも小さいことが明らかになった。

本研究では、これまで基礎的知見があるものの、その応用研究が少ない「植物の光修復の機能確認と利用方法」の一端を明らかにした。特に、光修復および暗修復による CPD 修復速度の差、蓄積した CPD を修復に必要な照射条件を明らかにした。今後、さらなる研究の蓄積により、UVB による収量低下を回避しながら従来よりも高品質な機能性野菜や薬用植物の生産が可能となる。また、二次代謝物質を効率的に蓄積させる技術にも応用可能と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川原田倫治・吉田英生・彦坂晶子・後藤英司
2. 発表標題 UV-B照射によるコマツナDNA損傷における光修復・暗修復機構の評価
3. 学会等名 日本生物環境工学会 2022年福岡大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂晶子・朝野翔一・後藤英司
2. 発表標題 UV-B照射時のB/R比がコマツナの生育，機能性成分およびDNA損傷に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂晶子・朝野翔一・後藤英司
2. 発表標題 UV-B照射後の青色光照射がコマツナの生育，機能性成分およびDNA損傷に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会 令和4年度春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 彦坂晶子・朝野翔一・後藤英司
2. 発表標題 UV-Bと青・赤色光の同時照射がコマツナの生育および機能性成分濃度に及ぼす影響
3. 学会等名 園芸学会 令和3年度秋季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	吉田 英生 (Yoshida Hideo) (40729852)	千葉大学・大学院園芸学研究院・助教 (12501)	
研究 分担者	加川 夏子 (Kagawa Natsuko) (60467686)	千葉大学・環境健康フィールド科学センター・講師 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------