

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：23303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05567

研究課題名(和文)ダイコンの内部褐変症の発生機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of the mechanism of internal browning of Japanese radish

研究代表者

福岡 信之 (Fukuoka, Nobuyuki)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授

研究者番号：30502637

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)：ダイコン内部褐変症の発生原因究明のため2種の実験を実施した。その結果、本障害の発生は、成熟期の高温によって誘起されるNADPH依存性ROSバースト由来のROS産生とリポキシゲナーゼ(LOX)などの脂肪酸分解酵素の活性化が関与することが明らかとなった。多量のROSや活性化したLOXは、膜構成脂肪酸の不飽和部位に作用し、膜脂質の過酸化することで膜崩壊を誘起する。この膜崩壊によって、酵素的褐変反応が進行し、障害に至る。なお、メイラード反応由来の最終糖化産物(AGEs)が褐変の主因とした当初の仮説は、膜脂質の過酸化の反応過程で生ずるカルボニル化合物由来のAGEsである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果は、ダイコン内部褐変症の発生原因を生理学的に究明するものとして、その新規性が認められ国際誌2編に受理された。本研究成果で得られた障害発生の鍵となるNADPH依存性ROSバーストやLOXなどの脂肪酸分解酵素に関わる遺伝子を改変することで、新たな障害抵抗性品種育成の可能性が示唆される。また、生育途中に貯蔵器官の内部が褐変化する障害は、ダイコン以外にもジャガイモ、キャッサバ、ナシ、リンゴなどでもみられ、本研究成果はこれら作物の褐変障害の発生機構を解明する上での基礎的知見ともなり得る。

研究成果の概要(英文)：Two types of studies were conducted to clarify the cause of internal browning in radish root. As a result, it was revealed that the occurrence of this disorder is related to ROS production via NADPH-dependent ROS burst and activation of fatty acid degrading enzymes such as lipoxygenase (LOX) induced by high temperature during root maturation stage. A large amount of ROS derived from NADPH-dependent ROS burst and activated LOX act on the unsaturated sites of membrane-constituting fatty acids and induce peroxidation of membrane lipids, thereby inducing membrane collapse. This membrane breakdown causes an enzymatic browning reaction to proceed, leading to damage. The initial hypothesis that advanced glycation end products (AGEs) derived from the Maillard reaction was the main cause of browning was suggested to be AGEs derived from carbonyl compounds generated during the reaction process of membrane lipid peroxidation.

研究分野：園芸学

キーワード：Heat stress Internal browning Lipid peroxidation Lipoxygenase Radish Reactive oxygen species Unsaturated fatty acid

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダイコンは冷涼性の作物で、夏の高温期に栽培すると様々な病害や生理障害が発生し、その品質は概して低い。中でも、根身内部が淡褐色から黒褐色を呈する生理障害「内部褐変症」は、その発生の有無を根の外観からは判断することができないため、生産者に多大な経済的損失を与えてきた。

ダイコンの内部褐変症の発生機構の解明に関する研究は、これまで栽培環境や無機成分との係わりで行われてきた。Fukuoka and Kano (1990)は、ダイコンを様々な生育ステージに高地温に遭遇させる区を設け、生育後半に 30 以上の高地温とする区で内部褐変症が多発することを認めた。本障害の発生原因に関する生理学的研究は、Fukuoka and Enomoto (2001) によって初めて行われ、高温によってアスコルビン酸グルタチオンサイクルの機能が低下し細胞内の ROS 濃度が高まること、この障害発生のトリガーとなる可能性が示唆された。しかし、この研究では、ROS 濃度や細胞が受けた酸化ストレスの強度についての調査がなされておらず、これ以降は本障害の発生機構の解明に関する研究は最近まで行われてこなかった。

### 2. 研究の目的

メイラード反応に関する研究は、褐変現象に関連して食品加工の分野では古くから行われてきた。その後、医学の分野で、この反応が生体内においても炭水化物とタンパク質との間で進行することが確認され、この反応によって作られる AGEs が糖尿病、動脈硬化、アルツハイマー病などの疾病に関係するとする多くの報告がなされた。その一方で、植物における生体メイラード反応の研究は少なく、最近になってようやく高温や早魃などのストレスがこの反応を亢進させることが明らかにされた (Chaplin et al., 2019)。しかし、これらは、いずれもシロイヌナズナの葉で得られた知見で、本申請課題とは植物種や対象とする器官が異なっている。さらに、シロイヌナズナの実験は、ストレスの付加が実験室内の人工環境下で行われており、実際栽培でみられるフィールド下での結果ではない。本申請課題はダイコンを実際のフィールドで栽培し、高温ストレスによって起こる本障害の発生を、生体メイラード反応の亢進や酸化ストレス反応の増大の観点から検討し、本障害の発生機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

メイラード反応や酸化ストレス反応と障害発生との関係を検討する以下の実験を実施した。

#### (1) 高温ストレスによって起こるダイコン内部褐変症の発生原因の検討

圃場に低温区、中温区、高温区を設けダイコンを栽培して内部褐変症の発生状況が異なる材料を作出し、様々なバイオマーカー（抗体）を用いて免疫組織化学的手法により、生体メイラード反応や酸化ストレスの亢進が内部褐変症の発生におよぼす影響を検討した。メイラード反応には非還元糖の存在が不可欠であることから、イオンクロマトグラフィーを用いて糖組成の処理区間差を比較するとともに、過酸化水素含量や二次代謝系に関連するエンザイムやポリフェノール含量の定量分析も行った。

#### (2) 高温遭遇時のバイオマスの差がダイコン内部褐変症におよぼす影響の検討

本障害はバイオマスの大きい生育の後半の根にみられることから、生育の様々な段階で密植から疎植とする区を設け、生育後半にバイオマスが異なるダイコンを作出して高温に遭遇させ、高温遭遇時のバイオマスの差が内部褐変症の発生におよぼす影響を検討した。酸化ストレスや

脂質の過酸化に関する代謝産物の抗原抗体反応、過酸化水素やポリフェノールの定量分析、二次代謝系のエンザイムの活性値などを測定した。

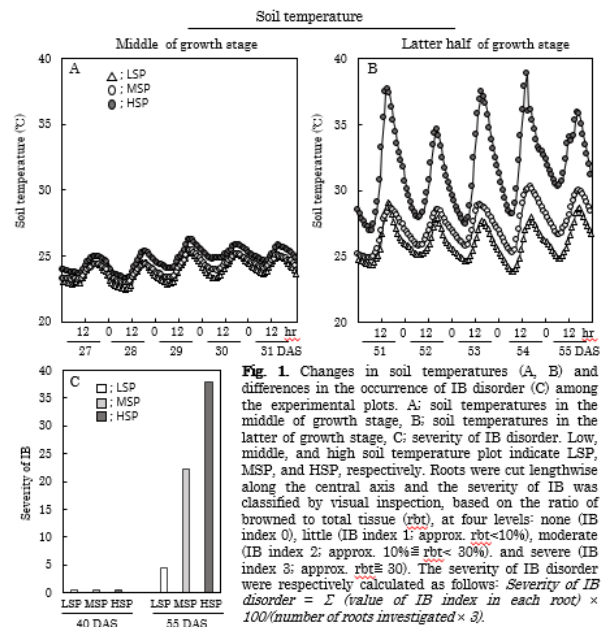
### (3) 高温ストレスによって誘導される関連遺伝子の発現解析

上記した と の実験で得られた材料を供試し、糖代謝関連遺伝子の発現解析を行うとともに、ROS発生に関係するNADPH依存性ROSバーストやミトコンドリア電子伝達系関連遺伝子、さらには脂質の過酸化に關与するリポキシゲナーゼ(LOX)遺伝子などの発現解析も実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 高温ストレスによって起こるダイコン内部褐変症の発生原因の検討

内部褐変症 (IB) の発生は、高温区、中温区、低温区の順に多かった(Fig.1)。障害の発生と還元糖濃度との間に一定の関係はなかったが、ROS 発生 の指標となる過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) 含量、POD 活性、Dityrosin (DT) の細胞における集積度や、二次代謝系の活性化の指標となるポリフェノール(PP)含量や PPO 活性は、いずれも障害が多発した区ほど高かった。膜脂質の過酸化の指標となる代謝産物や最終当科産物(AGEs) の集積度も障害が多発した区ほど高かった。本研究では、次に高温で誘導される ROS 産生 の場を明らかにするため、NADPH 依存性 ROS バーストとミトコンドリア電子伝達系に介在する多種の Enzyme について遺伝子の発現解析を行った。その結果、ミトコンドリア電子伝達系に介在する Enzyme の遺伝子の発現量と障害発生との間に一定の関係はなかったが、NADPH 依存性 ROS バーストに介在する Enzyme の遺伝子の発現量は障害が多発した区で高かった。これらの結果は、ダイコンの内部褐変症は以下のスキームで発生する可能性を示唆した。すなわち、根が成長段階後半に高温に曝されると、高温により根内で NADPH 依存性 ROS バーストが活性化し、大量の ROS が生成される。この細胞内の ROS 濃度の上昇によって膜脂質の過酸化が引き起こされ、反応性の高いカルボニル化合物が生成される。反応性カルボニル化合物は種々のタンパク質と反応し、褐色の物質の元となる様々な AGEs を産生する。さらに、膜脂質の過酸化によって膜の崩壊が起こり、不活性型としてアミロプラストに局在する PPO と、液胞に局在する PP がサイトゾルに放出される。その結果、細胞質ゾルで酵素反応が起こり、褐変物質が生成される。



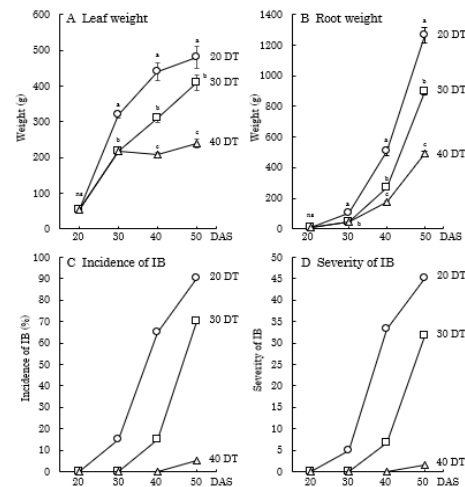
### (2) 高温遭遇時のバイオマスの差がダイコン内部褐変症におよぼす影響の検討

間引きが早い区は成熟期の根のバイオマスが大きく IB 障害が多発したが、間引きが遅い区では成熟期の根のバイオマスが小さく維持され IB 障害は発生しなかった(Fig.2)。早期間引き区の大い根では、後期間引き区の小い根と比べ、 $H_2O_2$  含量、POD 活性、NADPH 依存性 ROS バースト関連遺伝子、およびカルボニル化合物含量がいずれも高く、不飽和度の高い脂肪酸の構成比率 ( -18:3 / 18:2 ) も高かった。また、前者は後者に比べ、ホスホリパーゼ (PL) およびリ

ポキシゲナーゼ(LOX)関連遺伝子の発現レベルも高かった。

以上より、生育後半のバイオマスの大きな根では、高温下で ROS 濃度が上昇するとともに、LOX 活性が高まり、不飽和度の高い脂肪酸の構成比率 ( -18:3 / 18:2 ) も増加するものと思われる。その結果、膜脂質の過酸化による崩壊が起こりやすく、酵素的反応を介した IB 障害の発生に至るものと考えられた。

本研究で実施した 2 つの実験をとおして、ダイコンの IB 障害の発生機構の一端が明らかとなった。本研究結果は 2 つの論文として取り纏め、国際誌に投稿、受理・掲載された。



**Fig.2.** Cumulative growth curves (fresh wt.) of leaves (A) and roots (B), and changes in the occurrence of IB disorder (C, D) from the plots which were thinned from 12 to 4 plants per square meter at different times during the growing period. O; 20 DT, □; 30 DT, △; 40 DT. Error bars indicate  $\pm$  SE ( $n=20$ ). Different lowercase letters above the bars indicate significant differences at the 5% level by Fisher's LSD test. Roots were cut lengthwise along the central axis and the severity of IB was classified by visual inspection, based on the ratio of browned to total tissue (rbt), at four levels: none (IB index 0), little (IB index 1: approx. rbt<10%), moderate (IB index 2: approx. 10% $\leq$  rbt< 30%), and severe (IB index 3: approx. rbt $\geq$  30). The incidence (C) and severity (D) of IB disorder were respectively calculated as follows: *Incidence of IB disorder* = (number of roots exhibiting IB disorder)  $\times$  100/(number of roots investigated); and *Severity of IB disorder* =  $\bar{I}$  (value of IB index in each root)  $\times$  100/(number of roots investigated  $\times$  3).

## 引用文献

- Fukuoka, N., Kano, Y., 1990. Effects of duration of high soil temperature treatment on the occurrence of internal browning 'Akashin' in Japanese radish cv. Natsu-Minowase. *Bull. Ishikawa Agri. Coll.* 20, 23–28.
- Fukuoka, F., Enomoto, T., 2001. The occurrence of internal browning induced by high soil temperature treatment and its physiological function in *Raphanus* root. *Plant Sci.* 161, 117-124.
- Chaplin, A.K., Chernukhin, L., Bechtold, U., 2019. Profiling of advanced glycation end products uncovers abiotic stress-specific target proteins in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 70, 653-670.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryusei Watanabe , Nobuyuki Fukuoka , Tatsuro Hamada	4. 巻 43
2. 論文標題 Lipid Peroxidation Induced by Reactive Oxygen Species via NADPH-Dependent Oxidative Burst Triggers the Occurrence of Internal Browning in Radish Root	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Plant Growth Regulation	6. 最初と最後の頁 1479-1495
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10725-021-00765-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nobuyuki Fukuoka, Ryusei Watanabe, Tatsuro Hamada	4. 巻 10
2. 論文標題 Impact of changes in root biomass on the occurrence of internal browning in radish root	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.plaphy.2024.108563	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部 琉晟・福岡 信之・濱田 達朗
2. 発表標題 ダイコン内部褐変症の発生過程で生じる活性酸素種の生成・消去経路の検討
3. 学会等名 園芸学会北陸支部
4. 発表年 2022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	濱田 達朗  (Hamada Tatsuro)  (50310496)	石川県立大学・生物資源環境学部・准教授    (23303)	

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
---------	---------