

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580367

研究課題名(和文) 植物工場におけるワサビ種子周年生産のための効率的な花成誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of an efficient flowering induction system in a plant factory for a year-round wasabi seed production

研究代表者

野末 雅之 (NOZUE, Masayuki)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：30135165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： 植物工場で効率的なワサビの花成誘導法を確立するために、人工環境下で成育段階、日長および光質の影響を調べた。その結果、定植後4ヶ月以上育成したワサビ植物を1ヶ月間低温(4～8℃)下で、14時間以上のLED白色光に曝すことで花芽形成を効率的に誘導できることがわかった。LEDの光質(赤、青および遠赤色光)は花成誘導に影響しなかった。その原因として、この誘導条件下ではFT発現に日周性がみられず恒常的に発現していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)： Effects of growth stage, day length and light quality on flower-bud formation in wasabi (*Wasabia japonica*) were examined to establish an efficient flowering induction system in a plant factory for a year-round stable seed production. We showed that flower-bud formation occurs effectively in wasabi plant cultivated more than 4 months after planting by low-temperature treatment at 4-8 °C for one month and over 14 hours in the light period using LED white light (RGB). Light quality (blue, far-red and red light) has little influence on flower-bud formation, and FT, one of the essential flowering genes constitutively expressed in both light and dark periods under the above conditions.

研究分野：植物環境工学

キーワード：植物工場 ワサビ 花成誘導 LED

1. 研究開始当初の背景

ワサビ国内生産量は、平成 17 年以降、毎年減少し、10 年間でほぼ半減している(農水省統計情報)。一方、ワサビの需要は増大しており、加工用ワサビの原料不足が深刻化している。生産量激減の理由は生産農家の高齢化や生産地の温暖化などがあげられるが、最重要課題は良質なワサビ種子の持続的安定確保である。ワサビ種子は定植用実生苗生産に必須である。ワサビは系統(品種)の安定維持が容易でなく、開花期が長く結実率が低く、熟度にバラツキが多く、発芽が不揃いで発芽率も低い。また、長期間の乾燥保存ができない。このようなワサビ種子の特殊性がワサビ種子生産にとって大きな課題となっている。

ワサビ種子生産は、採種用ワサビ植物の育成、花成誘導、受精、結実、採種、後熟、保存などの過程が含まれる。ワサビ種子生産は長期間を要し、各過程で異なる環境が要求される。良質でより均一な種子を安定に生産するには、多大な労力と適切な環境管理が必要とされる。これらの種々の過程で植物工場を用いて、ワサビ種子の効率的な周年採種システムが開発できれば、ワサビ生産量の安定確保に画期的な貢献ができる。

2. 研究の目的

本研究では、ワサビ種子生産過程のうち、花成誘導に焦点をあて、人工環境下における効率的なワサビの花成誘導法の確立を目的とした。

ワサビは長日植物であり、花成誘導に光環境(光質と日長)が重要と考えられる。また、ワサビは花成誘導の分子機構の詳細な解析が進んでいるシロイヌナズナと同じアブラナ科植物であり、両者は基本的に同様な仕組みで花成が誘導されていると考えられる。長日植物の光周性花成誘導に關与する花成ホルモンの *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の発現と低温処理による *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (*FT* の発現を抑制) の発現抑制がワサビでも重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では、人工環境下で *FT* および *FLC* 発現を調査し、花成誘導に最適な光環境条件を明らかにした。また、ワサビとシロイヌナズナの花成誘導での異なる点、ワサビ植物体の成育段階と花成誘導能についても調査した。

3. 研究の方法

本研究では、ワサビ(*Wasabia japonica* cv. Daruma)の播種、育苗、植物体の育成のすべてを温度、日長、光質、二酸化炭素濃度を制御した人工環境下で行った。花成誘導実験にはすべて LED 光源(R:660 nm; G:520 nm; B:450 nm)を用い、(1)植物体の成育段階、(2)日長、(3)光質の *FT* および *FLC* 発現に対する影響を半定量的 RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法により調査した。花成誘導実験には、ワサビ実生苗を定植直後、あるいは定植 4 ヶ月以

上経過したものを供試した。必要に応じて、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)の花成誘導条件について、ワサビと比較調査した。

FT 発現を制御する CO タンパク質の日周性を確認するためにウェスタンブロットング解析を行った。用いたワサビ CO 特異抗体は、ワサビ CO cDNA をクローニングし、推測されるアミノ酸配列の一部を用いて作製した。

4. 研究成果

(1)ワサビ生育段階と花成誘導能

播種後 2 ヶ月間育苗したワサビ苗を定植し、定植直後および 4 ヶ月間、18 μ mol/m²s、LED 光源下(R/G/B=1/1/1, 40 μ mol/m²s⁻¹, 12L12D)で育成した植物体を用いた。それぞれ、異なる温度(10 および 18 $^{\circ}$ C)異なる日長条件下(8L16D および 16L8D)で栽培し、*FLC* 発現を半定量的 RT-PCR 法で、花芽形成を目視により調査した。定植直後の苗ではいずれの場合にも *FLC* 発現が抑制されなかったが、4 ヶ月経過したものでは 1 ヶ月間の低温処理で日長に關係なく抑制された。花芽形成は定植後 4 ヶ月以上経過したワサビ植物を低温、長日処理(16L8D)した場合のみ観察された。

成育段階の若いワサビ植物では花芽は形成されず、定植後 4 ヶ月以上成育が花成誘導に必要なことがわかった。この成育に伴う花成誘導能の獲得に、*FLC* 発現抑制をもたらす低温感受性が關与している可能性が示唆された。以降の花成誘導実験では、定植後 4 ヶ月以上経過したワサビ植物を用いた。

(2)ワサビ花成誘導に対する日長の影響

花成誘導に必要な明期時間について調査した。定植後 4 ヶ月経過したワサビ植物を 16L8D、14L10D、12L12D および 10L14D の異なる日長で 2 ヶ月間栽培し、*FLC* および *FT* 発現量をリアルタイム PCR 解析により調べた。また、目視による花芽形成の有無を確認し、花芽形成が確認された個体については花芽数を調査した。成育温度はすべて 8 $^{\circ}$ C、その他の光環境は(1)と同様に行った。2 ヶ月間の低温処理(8 $^{\circ}$ C)で *FLC* 発現の低下が確認され、14 時間以上の明期で *FT* 発現量が顕著に増加した。同時に多数の花芽形成が確認された。明期 12 時間では *FT* 発現量の顕著な増加はみられなかった。これらの結果から、ワサビ花成誘導には 14 時間以上の明期が必要であることがわかった。

(3)ワサビの花成誘導に対する光質の影響 青色光

ワサビ植物の花成誘導に対する青色光の影響について、シロイヌナズナと比較調査した。定植 4 ヶ月後のワサビ植物を青色光(B)(18 および 8 μ mol/m²s)および白色光(RGB)(8 μ mol/m²s)の照明下(いずれも 40 μ mol/m²s⁻¹, 12L12D)で栽培し、*FLC* および *FT* 発現量をリアルタイム

Δ PCR で解析した。また、目視による花芽形成の有無を確認し、花芽形成が確認された個体については花芽数を調査した。低温処理区ではいずれも *FLC* 発現が顕著に抑制されたが、青色光照射区 (8 および 18) で白色光照射区 (8) と比べて *FT* 発現量の顕著な増加はみられなかった。低温処理区では光質に関係なく多数の花芽形成が確認されたが、青色光による促進効果は認められなかった。

シロイヌナズナを播種後 4 週間、21、白色光 (RGB) $70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12L12D) で育成し、その後、青色光 (B) ($70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12L12D) 照射し、4 日おきに *FT* および *FLC* 発現量を半定量的 PCR 法で解析した。白色光 (RGB) ($70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12L12D) を同様に照射したものを対照区とした。青色光照射 8 日目以降に顕著に *FT* 発現が増大し、同時に抽台までの日数が短縮、花芽数と花軸数が増加した。

このように、シロイヌナズナでは花成誘導が青色光により顕著に促進されたが、ワサビでは促進効果がないことがわかった。

遠赤色光

定植 4 ヶ月以上経過したワサビ植物 4、 $30 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16L8D) と播種後 4 週目のシロイヌナズナ (21、 $70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12L12D) を白色光 (RGB) および白色光 (RGB) + 遠赤色光 (FR) の光環境下でそれぞれ育成した。ワサビは 1 ヶ月おきに、シロイヌナズナは 4 日おきに *FT* および *FLC* の発現量を半定量的 PCR 解析により調査した。なお、遠赤色光 (FR) の波長は 730 nm、R/FR 比は約 5 とした。

シロイヌナズナでは FR 照射により顕著な *FT* 発現と花成誘導の促進が観察された。しかし、ワサビでは FR 照射の *FT* 発現に対する影響はみられず、花成誘導についても白色光照射と変わりなかった。ワサビはシロイヌナズナと異なり、花成誘導に対して FR は影響しないことがわかった。

赤色光

赤色光による花成誘導抑制がシロイヌナズナで知られている。ワサビ植物で赤色光により花成誘導が抑制されるか否かを調査した。定植 4 ヶ月後のワサビ植物を赤色光 (R) および青色光 (B) の照明下 (いずれも $40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16L8D, 8) で 3 ヶ月間栽培し、*FLC* および *FT* 発現量をリアルタイム PCR で解析した。また、目視による花芽形成の有無を確認し、花芽形成が確認された個体については花芽数を調査した。上記の育成条件下では、赤あるいは青のいずれの単色光でも *FLC* 発現は抑制されたが、赤色光照射により *FT* 発現量は低下せず、両光質による違いはみられなかった。また、両実験区ともに花芽が形成され、赤色光照射による花成誘導は抑制されなかった。

なお、今回、赤色光の直接の影響を調べるために、赤色光単独照射区と対照区として赤色光を含まない青色光単独照射区とで育成

を行った。育成を開始して約 1 ヶ月経過後、赤色光単独照射区では葉の黄変や展開異常が観察された。青色光単独ではこのような成育障害は全くみられなかった。赤色光単独照射により傷害がみられた場合でも、*FT* 発現や花芽形成にはほとんど影響しなかった。赤色光照射による生育障害は、花成誘導とは関係なく光合成機能の障害が原因と考えられる。

(4) *CO* および *FT* 発現の日周性と花成誘導先の調査で、シロイヌナズナと異なり、ワサビの光周性花成誘導に対して光質は影響しないことがわかった。光周性花成誘導に長日植物の花成ホルモンである *FT* タンパク質は極めて重要な機能を担っている。シロイヌナズナでは *FT* 発現は *CONSTANS* (*CO*) の影響を受けて日周性を示す。ワサビの花成誘導に光質が影響しない原因を明らかにするために、*CO* および *FT* 発現の日周性について調査した。

白色光 (RGB) $40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 12L12D, 18 で育成した抽台前 (6~7 週) のシロイヌナズナの *CO* および *FT* 発現を 4 時間おきに半定量的 RT-PCR 法により解析した。*CO* は明期開始後 12 時間をピークに日周性を示し、*FT* の発現も 16 時間をピークに日周性を示すことが確認された。ワサビについても白色光 (RGB) $40 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, 16L8D, 4 で約 3 ヶ月間育成し、同様の実験を行った。ところが、ワサビでは明暗周期に関係なく *CO* および *FT* が恒常的に発現していた (図 1)。*FT* 発現は *CO* タンパク質により発現が制御されるので、ワサビでは *CO* タンパク質が恒常的に存在することにより *FT* が恒常的に発現している可能性が示された。

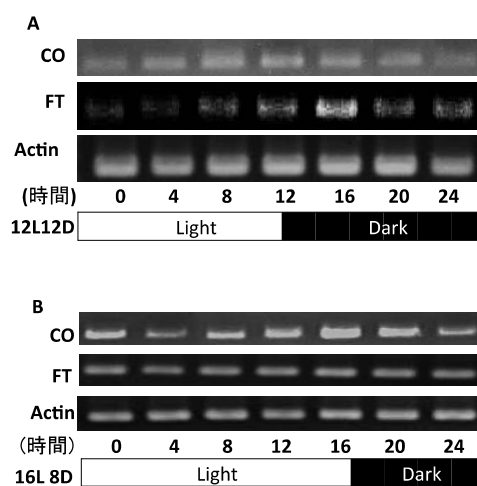


図 1 : シロイヌナズナおよびワサビにおける *CO* および *FT* 発現

A: シロイヌナズナ、B: ワサビ

シロイヌナズナでは *FT* 発現に日周性がみられるが、ワサビではみられない。*FT* 発現を制御する *CO* も同様にワサビでは日周性発現がみられない。

C0 タンパク質は暗期に分解されることが知られている。ワサビでは、恐らく C0 タンパク質が暗期で完全に分解されず、常に残存し、それが恒常的な FT 発現に関与すると考えられる。その可能性を確認するために、C0 タンパク質がワサビ植物で恒常的に存在しているかかの確認を試みた。ワサビ葉から経時的にタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析を行った。37 kDa 付近にシグナルを確認できたが、ワサビ C0 タンパク質の推定分子サイズ (33.5 kDa) と一致せず、現時点で C0 タンパク質の恒常的な存在は確認できていない。

<引用文献>

Kubo, H., Yoshida, K. and Nozue, M. Cloning of a FLOWERING LOCUS T ortholog in *Wasabia japonica* (Matsum). Biosci. Biotechnol. Biochem., 75:1823-1825, 2011.

Kubo, H., Yoshida, K. and Nozue, M. Cloning of a FLOWERING LOCUS C ortholog in *Wasabia japonica* (Matsum). J. Plant Biochem. Biotechnol., 21:117-120, 2012.

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)

Nozue, H., Okamoto, C., Matsuda, Y., Motoki, M., Kanemitsu, N. and Nozue, M. A year-round production system for wasabi nursery plants in a plant factory. Proceedings of the International Conference on Plant Factory 2014. 1:1-6, 2014, 査読無

野末雅之, 野末はつみ, 植物工場における省エネルギー栽培とワサビ苗生産, SEN' I GAKKAISGI (繊維と工業)70 巻, 80-85, 2013, ISSN 0037-9875, 査読無

Nozue, M., Kubo, H. and Yoshida, K. Cloning of flowering genes (WjFLC and WjFT) in Wasabi (Japanese horseradish) and monitoring of flowering response with their expression. International Journal of Biosciences and Biotechnology, 1:67-71. 2013, ISSN:9772302 257 000, 査読無

[学会発表](計 3件)

Nozue, H., Okamoto, C., Matsuda, Y., Motoki, M., Kanemitsu, N. and Nozue, M. A year-round production system for wasabi nursery plants in a plant factory. International Conference on Plant Factory 2014. 2014.11.10-12, Kyoto, Japan.

中俣孝一, 大木島晃, 野末雅之, 野末はつみ, 久保浩義, ワサビ (*Wasabia japonica*) 花成誘導に対する日長および光質の影響, 第 55 回日本植物生理学会年会, 2014 年 3 月 18-20 日, 富山大学 五福キャンパス, 富山県, 富山市

中俣孝一, 野末雅之, 久保浩義, 吉田澄司, 野末はつみ, 人工環境下におけるワサビ (*Wasabia japonica*) における花成制御遺伝子の発現と花成誘導, 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21-23 日, 岡山大学 津島キャンパス, 岡山県, 岡山市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野末 雅之 (NOZUE, Masayuki)
信州大学・学術研究院繊維学系・教授
研究者番号: 30135165

(2) 研究分担者

久保 浩義 (KUBO, Hiroyoshi)
信州大学・学術研究院理学系・教授
研究者番号: 60205127