

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450374

研究課題名(和文) 植物工場の生産性向上を指向した植物根渗出物の動的モニタリング手法の開発

研究課題名(英文) Development of monitoring method of root exudates for efficient food production

研究代表者

安保 充 (Abo, Mitsuru)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号：00272443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物工場における生産性向上を目指し、水耕液の経時分析を行った。CE-C4Dを用いて、ホウレンソウ水耕液中の主要イオン(K, Ca, Mg, Na, アンモニウム、硝酸、硫酸、リン酸)のモニタリングに成功した。また、微量元素のICP-発光分析によりCuイオンのモニタリングの必要性が示唆された。根の渗出物では、強い塩ストレス負荷時に遊離アミノ酸量の増加、発生ラジカルの減少を実験室レベルで確認した。植物工場ではこれらの量的変化の計測が困難であることが予想されたが、その一方で、水耕液中にストレスで増加する蛍光物質が存在し、ストレスマーカーとしての利用可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of improving the productivity of the plant factory, hydroponic solution was monitored. Major nutrients, K, Ca, Mg, Na, ammonium ion, nitrate, sulfate, phosphate, were analyzed by CE with capacitively coupled contactless conductivity detector (C4D). The major nutrients of NFT (nutrient film technique) hydroponic solution of spinach cultivation, were successfully measured. Among the trace elements, the need for monitoring of copper ion has been suggested. It has been also suggested that fluorescent substances in the hydroponic solution have the potential as stress markers of plants.

研究分野：分析化学

キーワード：植物工場 根渗出物 モニタリング C4D

1. 研究開始当初の背景

植物工場内では、室温、培養液の電気伝導度(EC)、液温、流速、湿度、光条件、二酸化炭素濃度などがモニタリングされ、至適条件で栽培されている。しかし、より高い生産性を目指すには、さらに詳細に条件設定することに加え、植物の環境ストレス応答を経時的に捉え、その状況に応じて条件変更することが必要である。中でも根から進出する物質を計測できれば、栽培環境に由来するストレスを感知し、栽培条件にフィードバックさせることが可能性である。

水耕液中の浸出物の分析は、1)土壌を用いた実験系が多様な要素を含み複雑であること、2)水耕液中の浸出物濃度が低いため、信頼性のある定量分析の系が作れなかったこと、3)浸出物の経時的データの不足や一般化できる指標物質が設定されていない、などの理由から生産現場では行われてこなかった。

2. 研究の目的

本研究では植物工場の循環型水耕液を分析することで、さらに詳細な作物の栽培管理による生産性向上を最終目標とする。大きく分けると、1)詳細な無機成分・栽培条件の管理・条件設定、2)植物側のストレス応答を、根からの有機酸やアミノ酸、活性酸素種:ROS と、それに由来する有機ラジカル種などの経時的分析を行い、ストレスマーカーの探索・設定を行い、植物工場水耕液の動的モニタリングを通して、最終的には安定な作物生産の効率化に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

実験室スケールの実験では、モデル植物として根の観察が容易な発芽ダイズを用い、エッペンチューブに入れた水耕液に、ダイズ根を一定時間浸漬させ、その水耕液を採取・フィルターをかけてから分析した。

植物工場スケールの実験では、太陽光型植物工場(明治大学黒川農場)において栽培・出荷されているホウレンソウの水耕液を用いた。栽培は、植物1個体あたりの水耕液量が少ない薄膜型水耕:NFT(Nutrient film technique)で行い、栽培資材(幅 1.3 m x 長さ 15 m)x 4 レーン分(約 5700 個体)の水耕液の一部を、苗を移植後、出荷までの3週間の間、サンプリング・分析した。

1)水耕液中の金属モニタリング

植物工場では、水耕液中の金属濃度を EC でモニタリングしているため、植物の金属取り込みの不均一性により、循環水耕中の金属イオンの濃度に偏りが発生する可能性がある。主要元素(N,P,K,Ca,Mg)を、キャピラリー電気泳動(CE)(Quanta4000, Waters)-非接触型電気伝導度検出器(C4D)(ET120, eDAQ)を用いて調べた。また、微量金属については ICP-OES(Optima8300,Perkin Elmer)、あるいは必要に応じて ICP-MS(NexION300,Perkin

Elmer)を用いて分析を行った。

2)水耕液中の有機酸・アミノ酸分析

有機酸は CE(P/ACE MDQ,BECKMAN COULTER)により分離し、間接法による検出を行った。

遊離アミノ酸はプロトコールに従って蛍光誘導体化し(AccQ・Tag™, Waters)、その蛍光を指標に HPLC(LC-10AD,Shimadzu)による分離定量分析を行った。

3)ROS およびラジカル種のモニタリング

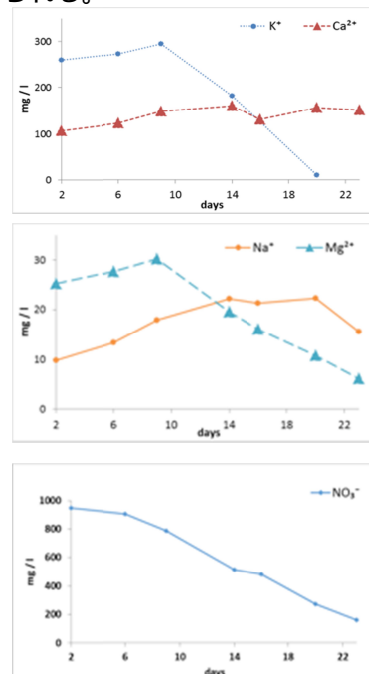
循環水耕液中の ROS をスピントラップ剤 DEPMP0(5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline N-oxide)を用い、ESR (JES-RE1X, JEOL)で分析した。また、トラップされたラジカル種の LC-MS による構造決定を試みた。

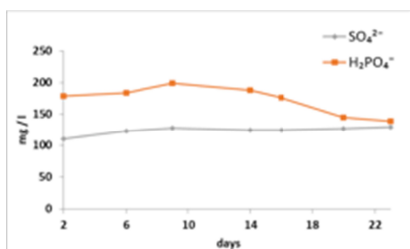
4)水耕液の蛍光分析

水耕液中に含まれる蛍光物質を 3D-励起蛍光スペクトル測定することにより分析した。(FP-8200,JASCO)

4. 研究成果

1) EC 計測に替わるものとして CE-C4D を利用した主要無機イオンの測定系を確立できた。本手法により主要陽イオン(K, Ca, Mg, Na, アンモニウム)、陰イオン(硝酸、硫酸、リン酸)をそれぞれ 3.5 分、8.0 分以内に検出可能で、その定量濃度範囲は、20-1000 μM、100-1000 μM あった。この測定系でホウレンソウ循環水耕液のモニタリングを行ったところ、定植後約 2 週間目以降の K, Mg, 硝酸、リン酸イオンは減少し(吸収量 > 供給量)、Ca、硫酸イオンは濃度が保たれた(図)。このように本測定系により、EC を用いた従来法より詳細な施肥条件の設定が可能になると考えられる。また、携帯型の CE-C4D も市販されており、再現性は劣るものの類似したデータが得られることから、今後は現場ですぐに栽培条件に反映させるといったニーズに合ったモニタリングへと本手法は発展していくと考えられる。





一方、微量元素では Fe, B, Cu, Mo, Zn について ICP-OES を用いて分析を行った。水耕液中には高濃度の硝酸カリウムが含まれているため、標準添加法により金属濃度を算出した結果、いずれの元素も過剰症を引き起こすほどの濃度には達しなかった。しかしながら、Cu イオンに関しては設定濃度の 20 倍である 0.8 ppm までその濃度が上昇することがあり、植物の生育の面からだけでなく排水処理面からも分析の必要性が示唆された。

#### 2) 有機酸・アミノ酸分析

有機酸は CE-間接吸光法を用いて分析を行ったが、水耕液成分に含まれる多量の硝酸、リン酸イオンが大きなピークを与え、また分析感度の低さなどの問題から定量分析には至らなかった。

遊離アミノ酸は、蛍光誘導体化とセミマイクロカラムの使用により、0.3 μM 以上での定量分析が可能であった。ダイズの芽生えを用いた実験室レベルの実験では、非常に強い塩ストレス(3% NaCl)下では、Glu, Ala, Tyr, Leu, Phe の水耕液中濃度の増加が確認されたが、想定される 0.5%程度の塩ストレス下ではアミノ酸の増加傾向は認められるものの、有意差を持った変化は確認できなかった。

さらに植物工場水耕液への応用が可能か検証したところ、ホウレンソウ水耕液中に Ser, Glu のピークが検出され、その濃度は 1 μM レベルであった。このことから、水耕液中のアミノ酸は検出できるレベルであることは確認できたが、アンモニウムイオンとは異なる大きな unknown ピークが現れ、多くのアミノ酸ピークと重なることから、モニタリングにはこの問題を解決する必要がある。

#### 3) ROS およびラジカル種のモニタリング

ダイズ芽生えを用いた実験において、NADPH オキシダーゼの発生させる ROS 由来の炭素中心ラジカルが DEPMPO のラジカル付加物として検出された。このラジカル種は、ESR シグナルの微細結合定数の値から“炭素中心ラジカル”と考えられる。0, 1, 3%の塩ストレスを負荷したところ、ストレス強度に応じてその発生量が有意に減少することがわかり、ストレスモニタリングに使用できる可能性が示された。但し、ラジカル種のトラップには根と DEPMPO を直接インキュベーションすることが必須であり、実用にはさらなる検討が必要である。

また、このラジカル種は有機溶媒による抽出・濃縮が困難であり、現時点で LC-MS によるラジカル種の構造決定は成功していない。

#### 4) 水耕液の蛍光分析

ダイズ芽生えを用いた実験により、塩スト

レス(0, 1, 3%)、24 時間で蛍光強度が増加するスポットを複数確認した。中でも塩ストレスだけでなく AI ストレスを負荷した場合にも共通して現れるスポットについて LC-MS による分取・構造決定を試みたが、現時点では決定に至っていない。根からの蛍光滲出物は、その検出感度からモニタリング指標に適しているが、この手法の今後の応用の広がりには、その発生メカニズムの推定などさらなる知見の収集が必要である。

#### 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 1 件)

長谷部 誉人、広島 千早紀、東良太、吉野 将紀、岡部 勝美、安保充、非接触型電気伝度検出 CE を用いる薄膜水耕における循環水耕液中の主要無機イオンの定量、分析化学、査読あり、65 巻、2016、283-288  
DOI: <http://doi.org/10.2116/bunsekikagaku.65.283>

##### 〔学会発表〕(計 4 件)

東良太、林俊弘、吉野将紀、岡部勝美、安保充、C4D 検出器を利用した植物水耕液の簡易分析、日本農芸化学会 2014 年度大会 2014.3.29.川崎

長谷部 誉人、東良太、吉野将紀、岡部勝美、安保充、C4D 検出器を利用した NFT 型水耕液の簡易分析(その 2)、日本農芸化学会 2015 年度大会 2015.3.28.岡山

江口 朋宏、長谷部 誉人、戸澤 譲、安保充、ストレス応答に關与する低分子リン酸化合物の分析法の開発、日本農芸化学会 2016 年度大会 2016.3.30.北海道

菊地 俊介、須山 隆大、城所 美紀、安保充、塩ストレス応答時の植物根蛍光滲出物の解析、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016.3.30.北海道

##### 〔図書〕(計 件)

##### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安保 充 (ABO, Mitsuru)  
明治大学・農学部・准教授  
研究者番号：00272443

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

藤井 紳一郎 (FUJII, Shin-Ichiro)  
産業技術総合研究所・計測標準研究部門・  
研究員  
研究者番号：10415739

加藤 愛 (KATO, Megumi)  
産業技術総合研究所・計測標準研究部門・  
研究員  
研究者番号：10415656