

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550097

研究課題名(和文) 極限生育環境を提供可能な植物栽培装置の設計と植物潜在能力解析

研究課題名(英文) Development of plant cultivation equipment capable of providing extreme growth environment and the analysis of the potential of plants

研究代表者

赤松 史光 (Akamatsu, Fumiteru)

大阪大学・工学研究科 ・教授

研究者番号：10231812

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)：本研究では、植物育成チャンバー(圧力、温度、光量、ガス組成を任意に変更可能)を用いて、昇圧環境が光合成速度および暗呼吸速度に対する影響を明らかにすることを目的として植物育成実験を行った。結果から、全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合には、総光合成速度は増加するが、二酸化炭素分圧を一定に保ったまま全圧を上昇させた場合には、総光合成速度は大きく減少する傾向が示された。この結果は、二酸化炭素分圧の上昇による光合成の促進の効果と酸素分圧の上昇による酸化ストレスの応答に起因すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study investigates effects of environmental conditions on net photosynthesis by using artificially controlled environment. This study discussed about the CO<sub>2</sub>-exchange rates of aseptic-medium-cultured plants, *Arabidopsis thaliana*, which were observed under the conditions of elevated ambient pressures from 0.1 MPa to 0.3 MPa. Results show that, while the net photosynthetic rate was increased, the rate of dark respiration fluctuated little under the elevated ambient pressures. It can be thought that these results come from the competitive reaction of the photosynthesis. Those are promotion of the photosynthesis by increasing CO<sub>2</sub> partial pressure and the suppression of the photosynthesis by increasing O<sub>2</sub> partial pressure.

研究分野：工学

キーワード：植物育成 極限環境 高圧 光合成速度

### 1. 研究開始当初の背景

近年、資源エネルギーや地球温暖化などの諸問題から、植物を活用し環境負荷を低減して社会を持続可能とするための技術が求められている。植物の光合成能力を解析することで、食糧や燃料バイオマスなどの生産性は向上してきた。しかし旧来の技術開発手法では限界があるため、新たな植物の潜在能力の開発が必要である。植物は3億6000万年前の石炭紀を中心に繁茂を極めた後、現存する40万種有余の植物へと進化を遂げた。石炭紀には平均気温は現在より10程度高く、二酸化炭素も現在の2.5倍の濃度を越えていたとされ、現在でも乾燥地域やツンドラ地域など、過酷な環境下で生育可能な植物種がある。

しかし、植物が極限環境でどのような潜在能力を発揮するかを探求した研究はほとんど無く、植物の環境要素を人工的に任意に設定できるシステムを構築することができれば、植物の未知の潜在能力を解明することが可能となる。さらに、極限環境への植物の応答は、表現型の解析に加えて遺伝子発現レベルでも解析できるため、得られた結果は遺伝子導入植物作出にも適用でき、極めて有用な成果となる。

### 2. 研究の目的

一般に、植物は生育環境が変化すると、生育環境の変化に応じて植物体内で生理的な変化が生じることが知られている(1-5)。この生理的变化が正常範囲を超えて機能障害を起こしている状態は、環境ストレスと呼ばれる。また、環境ストレスに対する植物の防御反応は環境ストレス応答と呼ばれる。環境ストレスは、ウイルスや細菌などにより植物を攻撃して生育を妨げる生物環境ストレスと、気温や光条件などの植物の生育環境が大きく変化することにより生育に変化を与える物理化学的ストレスの二つに大別できる。

物理化学的ストレスをもたらす環境因子には、主に、水、湿度、温度、光、大気成分組成、栄養分、雰囲気圧力などが挙げられる(6-23)。その成果の一部は、既に植物工場において実証されつつある。しかしながら、植物由来のバイオマス燃料を大量に生産するためには、これまでに得られている環境因子が植物生産に与える影響に加えて、新たな環境因子が植物生産に与える影響あるいは複数の環境因子の組み合わせによる影響の解明が求められる。本研究では、将来的に植物の生産性および品質を向上させることを目標として、物理化学的ストレスの一つである高圧ストレスに着目した。これは、高圧ストレスは植物の生育に密接に関わる光合成や呼吸に直接的に影響を与える可能性がある重要な環境因子の一つであるにもかかわらず、高圧ストレスが植物に与える影響は明らかにされていないためである。

### 3. 研究の方法

植物に高圧ストレスを与えるためには、植物が生育可能な育成装置において高圧条件を実現し、温度、湿度、光量等、他の植物育成に関わる環境因子を維持、制御することが求められる。本研究では、開放系を維持したまま高圧条件で植物を育成することが可能な植物育成装置を開発した。図1に植物育成装置の概略図および直接写真を示す。本研究で用いた植物育成装置は最大で0.6 MPa(abs)まで昇圧することが可能であり、圧力条件は育成期間の全期間にわたって維持することができる。植物育成装置の大きさは、内径( $\phi$ ): 130 mm、高さ(h): 145 mmであり、植物育成部の体積は1.9 Lである。本研究では、植物体の成長の逐次観察および装置内へ光を照射するために、植物育成装置の上部と側部はアクリル製とした。また、装置内の育成環境温度の制御を目的として、装置底面は熱伝導率の高いステンレス板を採用した。

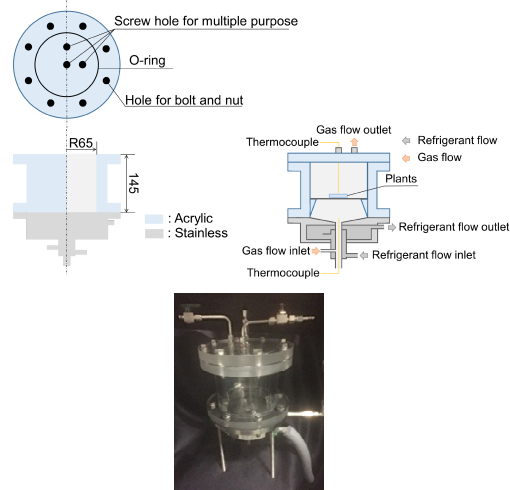


Fig. 1 Schematic drawings and a photograph of small-sized chamber

図2に、見かけの光合成量および暗呼吸量の計測に用いた実験装置の流路の概観図を示す。実験装置は、前述の植物育成装置のほかに、Non-dispersive infrared (NDIR)式ガスアナライザー(Li6262, LICOR社製)、NDIR式ガスアナライザーの校正用N<sub>2</sub>ガス、二酸化炭素分圧が異なる3種類の標準ガス、レギュレータ、マスフローコントローラ(Mass Flow Controller, MFC)、簡易冷却器、加圧ポンプによって構成されている。

植物を育成する際の光源には1台のLED灯および2本の環型蛍光灯を使用し、植物育成装置の上部から光を照射した。2本の環型蛍光灯は2段階で光量を調節できる。環型蛍光灯の光量調節機能および点灯させる蛍光灯の本数、卓上蛍光灯の植物育成装置上面からの高さを変更することで、光量は0  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ から200  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の間で任意に調節できる。

本研究では、環境ストレスの一つである圧力が植物の生育に与える影響を評価するこ

とを目的としているため、育成する植物はモデル植物（遺伝子構造の判明している植物）であることが望ましい。本研究では、*Arabidopsis thaliana*（シロイヌナズナ）を研究の対象とした。標準ガスを 500 mL/min で植物育成装置および NDIR 式ガスアナライザーに供給し、その差分をとることで見かけの光合成量および暗呼吸量を評価した。ここで、供給ガスの流量は、供給する標準ガス種を変更した際に、植物育成装置内を 10 分以内に十分に置換可能な値である。

植物育成装置内は実験開始直前に 70 %エタノールで滅菌処理を施した後に、シロイヌナズナを植え付けたシャーレを植物育成装置の上面から 120 mm の高さに設置した。圧力、光量、二酸化炭素分圧および、温度毎に明期、暗期を設定し、ガスアナライザーの表示値の収束値をその実験条件における見かけの光合成量および暗呼吸量とした。光量は明期を  $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  とした。なお、実験で使用したシロイヌナズナは、シャーレに 40 株播種し、春化处理した後に、人工気象器内で 15 日間育成したものである。表 1 に実験条件を示す。

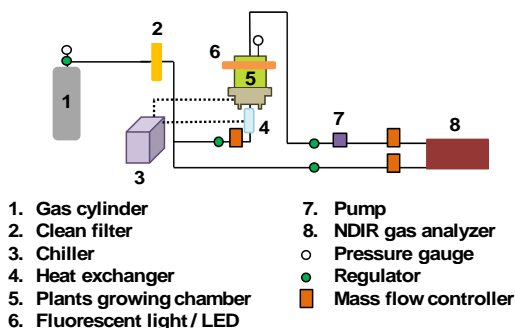


Fig. 2 Schematic illustration of growth experiment system

Table 1 Experimental growth conditions

Plant	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Light source	LED / Fluorescent light
Amount of Light ( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )	200 (light), 0 (dark)
Total gas pressure (MPa)	0.1, 0.2, 0.3
Partial Pressure of $\text{CO}_2$ (Pa)	40, 80, 120
Gas temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	24
Medium	1/2MS, including 0.7% Agar

#### 4. 研究成果

##### 4.1 高圧環境下が総光合成速度に与える影響

本研究では、高圧環境が植物に与える影響を評価するために、植物が成長に必要な炭素を外部とやり取りする手法である光合成および暗呼吸に着目している。植物は、光合成によって大気中の二酸化炭素から炭素を固定する。固定された炭素は、一次代謝産物の生成だけでなく、生育状態や環境による各種

二次代謝産物の生成に用いられる。一方、光合成による二酸化炭素の固定と同時に、暗呼吸によって炭素から生成される糖の一部は消費される。

本研究では、植物の育成環境のうち、高圧環境、二酸化炭素分圧を環境ストレス因子として操作する。全圧の上昇による影響と二酸化炭素分圧の影響を切り分けることを目的として、育成環境温度一定の条件において、二酸化炭素分圧を一定としたまま全圧を上昇させた条件における総光合成速度の変化と、全圧とともに二酸化炭素分圧が上昇する条件における総光合成速度の比較を行った。得られた結果を図 3 に示す。

ここで、総光合成速度は見かけの光合成速度と暗条件下の暗呼吸速度の和としたが、明条件と暗条件では暗呼吸速度が変化することが知られており、図 3 では加圧による相対的变化のみを見ることとする。全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合、総光合成速度は増加したが、二酸化炭素分圧を一定に保ったまま全圧を上昇させた場合には、総光合成速度は大きく減少した。

この結果は、光合成における二酸化炭素吸収プロセスである二酸化炭素受容体 (RuBP) の生化学反応により説明できる。酵素ルビスコが触媒するこの反応では、RuBP の二酸化炭素との結合 (カルボキシル化) と酸素との結合 (酸素化) が同時に進行するが、両者は競合阻害の関係にあり、酸素化は光呼吸による総光合成の損失をもたらす。十分に光がある時の総光合成速度  $P_g$  は、RuBP のカルボキシル化速度  $V_c$  および酸素化速度  $V_o$  より、次式で表される。

$$P_g = V_c - \frac{1}{2}V_o$$

$$= V_{cmax} \frac{1}{1 + \frac{K_c}{C} + \frac{K_c O}{K_o C}} - \frac{1}{2}V_{omax} \frac{1}{1 + \frac{K_o}{O} + \frac{K_o C}{K_c O}} \quad (1)$$

$$= V_{cmax} \frac{1 - \frac{V_{omax} K_c O}{2V_{cmax} K_o C}}{1 + \frac{K_c}{C} + \frac{K_c O}{K_o C}}$$

ここで、 $V_{cmax}$  および  $V_{omax}$  は最大カルボキシル化および酸素化速度、 $C$  および  $O$  は葉内二酸化炭素および酸素濃度、 $K_c$  と  $K_o$  はカルボキシル化と酸素化のミカエリス定数である。本研究では、酸素濃度および二酸化炭素濃度はそれぞれの分圧によって制御した。

式(1)の第三形によると、全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合、 $O/C$  は変化せず  $C$  は増加するため、総光合成速度は増加する。一方、二酸化炭素分圧を一定としたまま全圧を上昇させた場合、 $C$  は変化せず  $O/C$  は増加するため、総光合成速度は減少することがわかる。このように、総光合成における加圧の影響は、既知の光合成プロセスの反応速度論により説明できる。

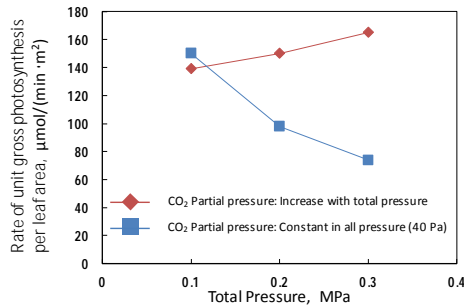


Fig. 3 Effect of partial pressure on the rate of gross photosynthesis at 24

#### 4.2 高圧環境下が暗呼吸量に与える影響

図4に、二酸化炭素分圧を一定としたまま全圧を上昇させた条件における暗呼吸速度の変化と、全圧とともに二酸化炭素分圧が上昇する条件における暗呼吸速度の関係について示す。図4より、全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合には、暗呼吸速度はわずかに増加傾向を示すことがわかる。一方で、二酸化炭素分圧を一定に保ったまま全圧を上昇させた場合には、暗呼吸速度は大きく増加する結果となった。

ここで、暗呼吸は、常圧で数%程度の二酸化炭素モル分率まで、顕著な応答を示さないとされる。また、酸素分圧に対する暗呼吸の応答は、よく知られていない。高酸素環境は植物の酸化ストレスを増大させるため、本研究において示された加圧による暗呼吸速度の増加は、酸化ストレス応答に起因する二次代謝による可能性がある。一方で、二酸化炭素分圧を一定に保った条件における全圧の上昇に伴う暗呼吸速度の急激な増加は未知の反応であり、今後の詳細な分析が必要である。

酸化ストレスを高める高圧は植物にとって厳しい生育環境であり、本研究の予備実験では加圧下での長期育成により、ほとんどの個体が脱色枯死した。一方で、常圧高酸素環境の組織培養株から選抜した酸素耐性を持つ個体は、低二酸化炭素での光合成能力が高いという報告がある。これより、加圧による酸化ストレス耐性の獲得あるいは加圧下での耐性株の選抜により、より生産性の高いバイオマス生産、あるいは抗酸化物質などの機能性物質生産が実現する可能性があると考えられる。

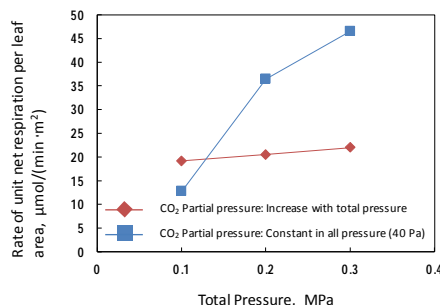


Fig. 4 Effect of partial pressure on the rate of dark respiration under 24

#### 5. 結 言

本研究では、将来的に植物の生産性および品質をより向上させるために、環境ストレスのうち高圧ストレスに着目し、高圧環境下で植物を育成することができる装置を開発し、高圧ストレスが植物に与える影響について解明することを目的とした。

開放系において、二酸化炭素分圧を一定に保って全圧を上昇させた条件、および全圧の上昇とともに二酸化炭素分圧が上昇する条件の総光合成速度および暗呼吸速度に対する応答を確認した。その結果、全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合、総光合成速度は増加するが、二酸化炭素分圧を一定に保ったまま全圧を上昇させた場合には、総光合成速度は大きく減少する傾向を示した。この結果は、二酸化炭素分圧の上昇による光合成の促進の効果と酸素分圧の上昇による酸素化ストレスの応答によって説明が可能である。

以上の結果は、光合成速度を増加させてバイオマス生産を上昇させる方策として、特に閉鎖系では非常に安価な方法を提示する。すなわち、CO<sub>2</sub>ガスを別途用意してCO<sub>2</sub>分圧を上昇させる代わりに、全圧を上昇させるだけでバイオマス生産が上昇することが期待される。

一方で、暗呼吸速度に対しては、全圧とともに二酸化炭素分圧を上昇させた場合には、暗呼吸速度はわずかに増加傾向を示すことがわかる。一方で、二酸化炭素分圧を一定に保ったまま全圧を上昇させた場合には、暗呼吸速度は大きく増加する結果となった。本研究において示された加圧による暗呼吸速度の増加は、酸化ストレス反応に起因する二次代謝による可能性がある。一方で、二酸化炭素分圧を一定に保った条件における全圧の上昇に伴う暗呼吸速度の急激な増加は未知の反応であり、酸素・二酸化炭素分圧の変化に対して今まで解明されていない経路が存在する可能性がある。実際に地球環境を数億年レベルで考えると、二酸化炭素濃度に対する酸素濃度の比が現在よりも高い時代も存在したと考えられていることから、進化の過程でそのような環境ストレスに応答する仕組みを植物が持っている可能性があり、今後、植物の潜在能力のひとつとして更なる解明が期待される。

#### 参考文献

- 1) 島本 功, 篠崎一雄, 白須 賢, 篠崎和子, 環境と生物ストレスに対する応答 (2007), 509-510, 共立出版.
- 2) 飯野盛利, 吉原 毅, 芳賀 健, 植物の成長調節, 44-2 (2009), 142-153.
- 3) 井澤 毅, 植物の成長調節, 44-2 (2009), 118-127.
- 4) 唐原一郎, 新谷 悠, 玉置大介, 神坂盛一郎, 根の研究, 19-2 (2010), 75.
- 5) 豊田正嗣, 古市卓也, 辰巳仁史, 曾我部正博, 生物物理, 45 (2005), S258.

- 6) 田中佐季, 本瀬宏康, 小野文久, 三枝誠行, 宇宙利用シンポジウム, 27 (2011), 171-173.
- 7) 佐久間洋, 篠崎和子, 蛋白質 核酸 酵素, 52-6 (2007), 543-549.
- 8) 梅澤泰史, 浦野 薫, 篠崎一雄, 蛋白質 核酸 酵素, 52-6 (2007), 502, 550-556.
- 9) 西田生郎, 蛋白質 核酸 酵素, 52-6 (2007), 524-529.
- 10) 末次憲之, 和田正三, 蛋白質 核酸 酵素, 52-6 (2007), 587-593.
- 11) 小野田雄介, 日本生態学会誌, 57-2 (2007), 145-158.
- 12) Sasaki, H., Fukuyama, M., Onoue, T., Suyama, T., Shoji, A., Grassland Sci., 48 (2002), 12-16.
- 13) Arp, W. J., Plant Cell Environ., 14 (1991), 869-875.
- 14) 難波和彦, 近藤 直, 門田充司, 笹尾 彰, 植物工場学会誌, 16-2 (2004), 41-49.38.
- 15) 藤森玉輝, 柳澤修一, 窒素応答, 52-6 (2007), 612-618.
- 16) Hinokuchi, T., Hashimoto, H. and Origino, V., 34-1 (2006), 51-53.
- 17) 石神靖弘, 後藤英司, 植物環境工学, 20-4 (2008), 228-235.
- 18) Goto, E., Ohta, H., Iwabuchi, K., Takakura, T., J. Agric. Meteorology., 52-2 (1996), 117-123.
- 19) 田中佐季, 本瀬宏康, 小野文久, 三枝誠行, 宇宙利用シンポジウム, 27 (2011), 171-173.
- 20) Morimoto, T., Torii, T., Hashimoto, Y., Control Eng. Practice, 3/4 (1995), 505-511.
- 21) 高山真策, 米良信昭, 秋田求, 植物環境工学, 24 (2012), 224-232.
- 22) Daunicht, H. J. and Brinkjans, H. J., Adv. Space Res., 12-5(1992), 107-114.
- 23) Gaastra, P., Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, 59(1959), 1-68.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) **【解説】赤松史光, 林 潤, 武石裕行, 岡澤敦司, 木村康裕, 小林昭雄, 特殊環境化での植物育成を可能とするインテリジェント生産検証システムの構築, レーザー学会誌レーザー研究, 44-11(2016), 735-739.**
- 2) **林 潤, 米倉 幹, 武石裕行, 澤田晋也, 木村泰裕, 岡澤敦司, 町村 尚, 小林昭雄, 赤松史光, 高圧環境におけるシロイヌナズナの光合成応答に関する実験的考察, レーザー学会誌レーザー研究, 44-11(2016), 745-749.**

〔学会発表〕(計4件)

- 1) S. Sawada, M. Yonekura, H. Takeishi, J. Hayashi, T. Machimura, Y. Kimura, A. Kobayashi and F. Akamatsu, Effects of elevated ambient pressure and temperature on rates of net photosynthesis and dark respiration, 22nd International Conference on Plant Growth Substances, Toronto, Canada, June 2016.
- 2) M. Yonekura, H. Takeishi, H. Awata, J. Hayashi, Y. Kimura, Atsushi Okazawa, Takashi Machimura, Akio Kobayashi and Fumiteru Akamatsu, Effects of elevated ambient pressure on the rates of net photosynthesis and dark respiration, Proceedings of the Japanese Society for Chemical Regulation of Plants, (2014.7.16).

- 3) 澤田晋也, 米倉 幹, 武石裕行, 木村泰裕, 林 潤, 小林昭雄, 赤松史光, バイオマス燃料の高付加価値化に向けた植物育成-高圧環境が葉の生長に与える影響についての実験的考察-, 第32回学生自動車研究会卒研講演発表会, 44, 大阪, 2016年2月.
- 4) 米倉 幹, 武石裕行, 澤田晋也, 林 潤, 木村泰裕, 岡澤敦司, 町村 尚, 小林昭雄, 赤松史光, 植物の生産性向上に向けた高圧環境の利用, 関西支部第91期定時総会講演会, 206, 大阪, 2016年3月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

1. 澤田晋也, 植物化学調節学会 第22回国際植物生長物質会(IPGSA)派遣補助金, 2016.
2. 澤田晋也, 第22回国際植物生長物質会議派遣補助金助成者報告, 植物の生長調節, 植物化学調整学会, 51巻-2号, pp157-158, 2016.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

赤松 史光 (Fumiteru Akamatsu)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 10231812

(2)研究分担者

小林 昭雄 (Akio Kobayashi)  
大阪大学・工学研究科・招へい教授  
研究者番号: 30115844

(3)研究分担者

林 潤 (Jun Hayashi)  
大阪大学・工学研究科・講師  
研究者番号: 70550151

(4)研究分担者

木村 泰裕 (Yoshihiro Kimura)  
大阪大学・産業科学研究所・特任助教  
研究者番号: 10432361