

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660028

研究課題名(和文)新規植物育成技術「Shigyo法」の原理解明：赤青の交互照射に対する植物の応答

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism for novel plant cultivation technology, Shigyo method:
Plant response to alternating irradiation of red and blue

研究代表者

執行 正義 (SHIGYO, MASAYOSHI)

山口大学・創成科学研究科・教授

研究者番号：40314827

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)：植物工場における光源として利用が広がりつつある赤色LEDと青色LEDを用い、両者の交互照射により植物の育成を爆発的に高める新規植物育成法「Shigyo法」が開発されている。Shigyo法は簡単な光照射技術で植物の生育を早められるため実用化が先行しているが、その原理の解明が待たれている。本研究では、植物の光応答に着目し、主にシロイヌナズナを材料としてマイクロアレイ技術を駆使した遺伝子発現の網羅解析と時系列研究を組合せて行うことで、赤/青交互照射条件下における赤色光受容体および青色光受容体の挙動とそのシグナル経路の変化の状況把握を行った。

研究成果の概要(英文)：The alternating red and blue light accelerated plant growth significantly even when the total light intensity per day was the same as with simultaneous irradiation. Although the mechanism of physiological response and signal transduction pathways underlying the response to the alternating irradiations are the issues for the next study, we offer a novel plant growth method, named "Shigyo Method", whose core concept is alternating irradiation of red and blue light. In this study, lighting methods by using red and blue LEDs were examined to obtain the optimum irradiation condition for *Arabidopsis thaliana*. Furthermore, exhaustive gene expression analyses by DNA microarray, together with a time series study during a single-day in both the irradiation conditions were carried out to understand the behavior of red and blue light receptors as well as to know their signaling alterations, under the alternating condition.

研究分野：園芸科学

キーワード：赤色LED 青色LED 光合成有効光量子束密度 フォトリポシン変異株 赤青同時照射 赤青交互照射
シロイヌナズナ R/B比

1. 研究開始当初の背景

食の安全や生産の計画性を高める新しい技術として、植物工場が注目されている。植物工場はだまかに太陽光併用型と完全人工光型の2つのタイプに分類され、太陽光利用型は従来の施設園芸の知識や設備を利用できるという利点があるが、完全人工光型は光、温度、湿度、栄養分などを厳密に制御可能という利点がある (Shiina et al. 2011)。ものづくり技術の集積、科学的な知見の適用など農業分野におけるイノベーション創出の観点から、完全人工光型の植物工場への期待が高まっている。

完全人工光型の植物工場における光源として、LEDの利用が広がりつつある。LEDは波長指向性が高く、植物の光合成に有効な赤色光や青色光(クロロフィルの吸収極大:赤680 nm付近,青450 nm付近)を選択的に照射できるという利点を有している (Massa et al. 2008)。しかしながら、初期コスト高の問題やLED下での生育が自然光には敵わないといった問題があり、特に後者の問題については植物側からの科学的・分析的アプローチによる解決が求められていた。

申請者らは、赤色LEDと青色LEDを用いた植物の育成のため、リーフレタスを材料として赤色LED単独、青色LED単独、赤青の混合の各条件下で育成試験を行った。この過程において、赤色光と青色光とを交互に照射することによって、植物の育成を爆発的に高める新規な植物育成法「Shigyo法」の発見に至った (Shimokawa et al. 2014)。Shigyo法により、同じ期間、同じ光合成光量子束密度 (PPFD) 下において蛍光灯と比べ最大で新鮮重が最大2.5倍になるという結果を得ており、完全人工光型植物工場での実用化もスタートしている。

赤色光と青色光の交互照射という非常に単純な方法でもあるため、実用化が先行しているShigyo法であるが、植物の中で何が起きているか、どのような機構が働いて植物の生育が促進されているかが明らかになっておらず、その原理解明が待たれている。

2. 研究の目的

農業分野における技術革新として、光や温度、栄養分などを厳密に制御可能な植物工場が注目されている。申請者らは、植物工場における光源として利用が広がりつつある赤色LEDと青色LEDを用い、両者の交互照射により植物の育成を爆発的に高める新規植物育成法「Shigyo法」を発見した。Shigyo法は簡単な方法で植物の生育を早められるため実用化が先行しているが、その原理解明が待たれていた。本研究では、植物の光応答に着目し、シロイヌナズナ及びリーフレタスを材料として、赤/青交互照射条件下における赤色光受容体、及び青色光受容体の挙動とそのシグナル経路の変化を明らかにする。本研究は植物工場という社会的に関心の高い課題を扱うだけでなく、植物の光応答という

科学的に重要な課題に新たな光を当てる挑戦的な研究である。

3. 研究の方法

本研究では、申請者らが発見した新規植物育成技術「Shigyo法」の原理解明を目指し、シロイヌナズナとリーフレタスを材料に、特に赤色光と青色光に対する光応答に着目した研究を行う。【項目0~1】シロイヌナズナにおけるShigyo法の最適条件を確立し、この下で受容体の変異株がどのような応答を示すか、形態、成長、光応答反応などの現象面を押さえる。【項目2~3】更に、野生株を用いて赤色光/青色光それぞれの下での発現遺伝子とその変動を把握し、Shigyo法のキーとなる遺伝子の候補を絞り込む。これらの遺伝子について、赤色光/青色光条件下でのタイムスタディを行い、候補遺伝子がどのような振る舞いを示し、それが成長促進という現象に結びつくかを明らかにする。【項目4】シロイヌナズナの成果をリーフレタスに還元し、これらの遺伝子の品種間での発現比較を行うとともに、調節領域を探索してマーカー選抜につなげる。

4. 研究成果

本科学研究費補助金による研究成果を項目毎にまとめると以下ようになる。

【項目0】シロイヌナズナ‘コロンビア’を人工気象器内で、PPFD160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、温度25 $^{\circ}\text{C}$ および湿度50%で生育させた。実験区として、赤青比4:1区、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4を設け、対照区には蛍光灯を用いた。播種後32日目に新鮮重、葉身長、葉幅長および葉柄超を測定し、最適な赤青比を検討した。その結果、1:2区において蛍光灯と同程度の生育量がみられ、LED照射区の中では最もよく生育していた(第1図)。したがって、最適な赤青比は1:2であることが分かった。

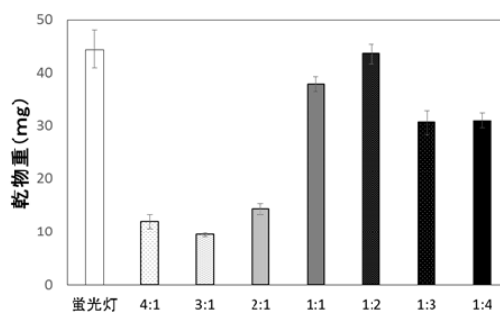


図1 各赤青比で生育させたシロイヌナズナの新鮮重および乾物重 (n=6)

【項目1】フォトトロピン二重変異株‘phot1 phot2’および野生株をそれぞれ育苗床へ播種した後、7日間蛍光灯下において発芽・生育させた幼苗を恒温・恒湿室内(25 $^{\circ}\text{C}$, RH50%)に設置した人工気象器に移して21日間栽培した。赤色LED(660nm)と青色LED(450nm)を単独で用いた処理区では、PPFD 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ となるようにし、両者を併用した区では、赤青比を1:1に調整してPPFD 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ となるようにした。照射終了後、植物

体を採取し、新鮮重について調査した。その結果、蛍光灯対照区での変異株の生育は野生株に比べて劣っており、同様な現象が青色区でもみられた。また、赤色区では、両者の違いは明確にあらわれなかった。赤青同時照射（12時間日長）区では、野生株の生育は著しく向上したが、変異株については赤色区とほぼ同程度であった。また、赤青12時間交互照射区では、変異株のみならず野生株においても著しい生育遅延がみられた。以上より、二重変異株では、赤青交互照射による明確な生育促進効果はみられず、2つの青色光受容体が生育促進効果に深く関与していることが示唆された。

【項目2】赤青比1:2を用いた交互照射により栽培し、①赤色光照射時、②光切り替え直前（30分前）、③光切り替え直後（30分後）および④青色光照射時の4時点の植物体から抽出した全RNAをそれぞれマイクロアレイ解析に供試し、光受容体、光応答、光合成、概日リズムおよび細胞周期に関連する遺伝子の発現量の増減に関するヒートマップを作成した。この遺伝子発現解析の結果を精査したところ、39個の光受容体に関連する遺伝子、328個の光応答関連遺伝子、104個の光合成関連遺伝子、62個の概日リズム関連遺伝子および494個の細胞周期関連遺伝子が検出された。①および②の時点では、光合成や細胞分裂に関連した遺伝子が、また、③および④では、葉の伸展や形態形成に関連する遺伝子の発現量がそれぞれ増加しており、これら遺伝子の中に交互照射による生育促進効果に関与するものが見出される可能性が示された。さらに、赤色光照射時には、光呼吸系のGS-GOGATサイクル中のグルタミン酸合成酵素遺伝子や多くの光化学系I遺伝子の発現量が増加した(図2)。青色光照射時には、GS-GOGATサイクル中のグルタミン合成酵素とサイクル外にあるグルタミン酸-グリオキシル酸アミノ基転移酵素遺伝子の発現量が増加し、グルタミン酸の基質となるグルタミンとオキソグルタル酸の蓄積が促されることが推察された。また、青色照射時には、光化学系Iの末端部で働くフェレドキシンやフェレドキシン-NADP還元酵素の遺伝子発現量が増加し、赤色照射時に蓄積したエネルギーを青色照射で一気に炭酸固定へ進める流れが示唆された。さらに、青色照射時には、フェレドキシン依存型グルタミン酸合成酵素遺伝子の発現量が若干増加しており、フェレドキシンと酵素の複合体の形成により電子の受け渡しがなされ、光エネルギー分配に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、‘コロンビア’を赤青比1:2の赤青同時照射により栽培し、①赤色および青色光照射時、②消灯直前、③消灯直後および④暗期時の4時点の植物体から抽出した全RNAをそれぞれマイクロアレイ解析に供試し、生育促進に関連することが予想される遺伝子の発現量の増減に関するヒートマップを作

製した。その結果、39個の光受容体に関連する遺伝子、328個の光応答関連遺伝子、84個のアミノ酸関連遺伝子、81個の窒素代謝関連遺伝子、107個の光合成関連遺伝子、62個の概日リズム関連遺伝子、223個の糖新生/糖分解関連遺伝子および494個の細胞周期関連遺伝子が検出された。①および②の時点では、フィトクロムやアミノ酸の合成に関連した遺伝子が、また、③では、開花に関連する遺伝子の発現量がそれぞれ増加していた。同時照射の試験においては、アミノ酸合成に関連する遺伝子は①および②の赤青同時照射時に発現量が増加した。

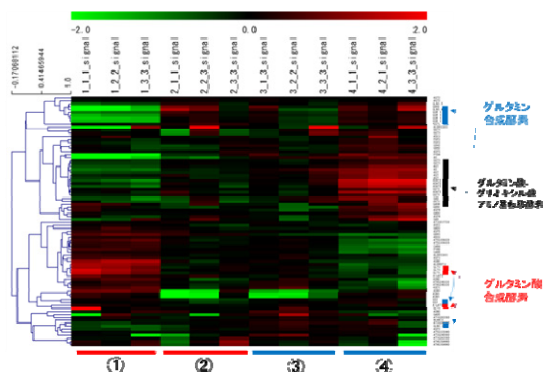


図2 交互照射条件下におけるシロイヌナズナのアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸代謝関連遺伝子の発現解析に基づくヒートマップ

以上より、赤青交互照射は、様々な代謝経路において遺伝子発現の仕分け効果を高め、光が切り替わると基質の触媒作用やエネルギーの伝達が一気に進み生育や代謝の促進効果を促すことが推察された。

【項目4】数多くのリーフレタスサンプルを解析して試験結果を効率的に蓄積していくためにはトランスクリプトームデータベースを構築し、活用していく必要がある。そこで、様々な品種・系統を用いてRNA-Sequencingを実施して同データの大量収集を開始している。さらに、メタボロームデータとの統合も視野に入れ、オミクス統合データベースを開発していくことも考えている。これらの一連の統合解析より、赤青交互照射で生育しやすい遺伝子型が抽出され、同照射条件に適した植物工場専用品種の開発を加速させていきたいと考えている。

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)

〔学会発表〕(計2件)

- ① 吉田華奈子・西澤美秋・清水政仁・執行正義、赤青の交互照射に対する植物の応答からみた生育促進の仕組みについて、園芸学会平成29年度春季大会、2017年3月20日、日本大学(神奈川県藤沢市)
- ② 執行正義、赤・青LED交互照射によるリーフレタスの生育促進、平成28年度園芸学会秋季大会シンポジウム、2016年9月10日、名城大学(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

執行 正義 (SHIGYO, Masayoshi)

山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：40314827