

## LED 光源を用いた植物の二次代謝物質合成制御光スペクトルの探究

谷野 章, 青柳里果, 浅尾俊樹

## 目 的

ワサビ *Eutrema japonica* (Miq.) Koidz. の辛み成分には重要な価値があり, 例えば, 日本の生魚食には欠かせない香辛料である. 自然のワサビ繁殖環境は, 冷涼な清流域にあり, そのような環境を人工的に設けて商業用に大量栽培することは容易ではない. したがって, ワサビを効率的且つ経済的に人工環境で栽培する技術の開発が望まれている (Oguni *et al.*, 2005). 人工環境でワサビを栽培するためには, 施肥, 温湿度, 光などの最適条件を決定する必要があるが, 現状ではどれも不確定である. 本プロジェクトでは, ワサビの辛味成分アリルイソチオシアネートの前駆体であるシニグリン生成量に影響を及ぼす光スペクトルを探索することとした. 特徴的なスペクトルの光を照射されたワサビ体内のシニグリンの濃度・分布・局在を調べることで, シニグリン生成に影響を及ぼす光スペクトルの作用機構の手がかりを探す. 植物の組織あるいは細胞内の分子分布の観察は, 高い空間分解能と広い面分布分析を両立するダイナミックレンジの大きい表面分析法によって可能となるが, そのような研究例は少ないため (Aoyagi *et al.*, 2013), 観察手法の確立自体にも大きな意味がある. シニグリン量および分布の解析結果から, 光スペクトルによるワサビのシニグリン生成量制御の可能性を推察する.

## 方 法

—実験1— ワサビ幼植物体への PPFD  $262 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の近似太陽光の3日間の照射とシニグリン濃度—

茎頂培養由来のワサビ幼植物体を 50ml プラスチック製試験管の中に入れて, 30ml の 50% 園試処方 (Hori, 1966) 培養液を加えた. その試験管開口部の直径は 30mm である. この試験管を LED 光源 (Fujiwara and Yano, 2011) の照射口に差し込んだ. その後, アルミフィルムで試験管全体を覆い, 外部への光の漏れを防いだ. LED 光源は放射光のピーク波長が 385-910nm の範囲の 32 種類の LED 547 個で構成される. この LED に制御電流を供給し, 曇天日の朝に松江市で実測した屋外の分光光子束密度 (spectral photon flux density, 以下 SPFD) の近似光を幼植物体に 12 時間明期, 12 時間暗期のサイクルで 3 日間照射した. 照射口における SPFD はスペクトロラジオメーター (MS-720; Eko Instruments Co., Ltd.) で測定した. 光合成有効光子束密度 (PPFD; 波長 400-700nm) は 262

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であった (LI-190SB; Li-Cor Inc.). 光源装置と幼植物体を入れた試験管全体を人工気象器内に置いた. 3日間の人工気象器内の気温は  $19.3 \pm 0.3^\circ\text{C}$  であった. 照射後の幼植物体の生重を計測した後, シニグリンの分解を防ぐ目的で, オートクレーブで  $110^\circ\text{C}$ , 10 分間, 加温, 加圧した後, 冷凍保存した. 蛍光灯 (FL40SS・ENW/37H; Panasonic) を配備した恒温室内でも前歴が同じワサビ幼植物体を培養した. この時, ワサビに照射された PPFD は  $88 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であった. 照射後に冷凍保存していた幼植物体の含有シニグリン濃度を液体クロマトグラフィー (LaChrom Elite; Hitachi High-Technologies Co.) で分析した.

—実験2— ワサビ成体葉への PPFD  $83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の近似太陽光の3日間の照射—

恒温室内 (蛍光灯, 温度制御  $20^\circ\text{C}$ ) で, 地上部全高 10 cm 程度になるまで栽培した茎頂培養由来のワサビ成体を, 実験室の半自然環境条件で 4 日間放置した後, 本実験に供試した. バーミキュライトを入れた 210ml のプラスチック製容器に供試ワサビ成体を移植した. 最初の暗期 12 時間の後の明期 3 時間の時点で 10ml の培養液 (50% 園試処方) を培地に加えた. その 24 時間後に培養液を 20ml, さらにその 24 時間後に培養液を 20ml 培地に加えた. 1 枚の成葉の片側に LED 光源の照射口を接近させた. LED に制御電流を供給し, 晴天日の夕方に鳥根大学で実測した屋外の SPFD の近似光をワサビ葉に 12 時間暗期, 12 時間明期のサイクルで 3 日間照射した. ワサビに照射した LED 近似太陽光の PPFD は  $83 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  であった. LED の光が照射されない部分には, 人工気象器の光学的隙間から進入する実験室内の半自然光が僅かに照射された. 3日間の人工気象器内の気温実測値は  $19.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$  であった. 3日間の照射終了時点で, 照射葉部の透過スペクトルおよび非照射葉部の透過スペクトルをそれぞれ計測した.

—実験3— ワサビ成体葉柄横断面の TOF-SIMS による分析—

半自然光下で栽培したワサビ成体の葉柄を 1cm の長さで切り出し, シャーベット状の 77K の脱気液体窒素中に数秒間入れて凍結させた. その凍結組織片表面を包埋材 (White Tissue Coat; ユーアイ化成株式会社) でコーティ

ングした。包埋試料を再び脱気液体窒素中に入れて凍結させた。この試料を保冷剤で冷やした金属板上に乗せ、メスで試料を横断方向に薄切した。この薄切片を TOF-SIMS 測定用の ITO ガラス基板上に葉柄の断面片側が基板に接触するように置いた。これらの基板設置試料をデシケイターに入れて真空乾燥させた。各試料は TOF-SIMS (TRFT V NanoTOF, Ulvac-Phi, Chigasaki) で、一次イオン源に 25keV の  $\text{Bi}_3^{++}$  を用いて測定した。測定は、スタティック限界内でイオンドーズ量を  $10^{12}$  ions/cm<sup>2</sup> として実施し、 $500\mu\text{m} \times 500\mu\text{m}$  の測定面積で、正負二次イオンスペクトルを取得した。

### 結果と考察

—実験1— LED の光を 3 日間照射したワサビ幼植物体の生重当たりのシニグリン濃度が 12.18mg/gFW で最大であった。同じ個体の下位葉には、アルミフォイルによる散乱光および上位葉の透過光が照射された。この下位葉のシニグリン濃度は 8.28mg/gFW と 2 番目に高い値であった。蛍光灯の光を照射した幼植物体のシニグリン濃度は LED の光を照射した幼植物体のそれより 1 桁小さかった。LED の光を照射したワサビ幼植物体のシニグリン濃度が高かったことから、広い波長範囲のスペクトルを有する LED の近似太陽光がシニグリン生産に有効であると期待したが、人工気象器内で LED 光源の横に試験管のフタを開口して静置した幼植物体のシニグリン濃度も 4.28 mg/gFW と比較的高かったことは、この期待を否定する。この幼植物体には、LED からの光は照射されていなかった。中島ら (2007) によれば、2 週間光照射無しでもワサビ地下茎のシニグリン濃度が低下しないことが報告されている。したがって、供試幼植物体間に元々シニグリン濃度の相当な差が存在した可能性がある。

—実験2— 光照射葉部と非照射葉部いずれについてもクロロフィルの吸収帯で目立った透過光の減衰 (すなわち葉による吸収) があった。非照射葉部と照射葉部の透過 SPFD の差を求めると、500-600nm および 700-750nm 付近に目立ったピークが存在した。したがって、LED の光を照射した葉部ではこれらの波長帯の光を吸収する色素の濃度が高かったことが示唆される。

—実験3— TOF-SIMS によってワサビ成体葉柄横断面の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{KNO}_9\text{S}^{2+}$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{KNO}_9\text{S}^{2+}$ ,  $\text{C}^-$ ,  $\text{S}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_2\text{H}^-$  分布像を得た。これらのイオンの分布像は、細胞壁の形状を反映しており、細胞壁を破壊することなく TOF-SIMS 分析用のサンプルが作成可能であ

ることが確認できた。しかしながら、TOF-SIMS でシニグリンを同定することはできなかった。細胞壁を破壊せずに TOF-SIMS 分析用試料を作製する手法は、本研究着手時点では未確立であった。液体窒素による凍結では、細胞内の水分の膨張によって細胞壁が壊れてしまうことが多い。細胞を壊さないためには細胞内の氷晶の成長を抑える急速凍結が必要である。液体プロパンを用いると急速な凍結が可能だが、新たな設備が必要となるため、本研究では液体窒素を用いて、より急速な冷凍方法を試した。その結果、真空下で脱気した液体窒素によって細胞の破壊を抑制した試料作製がある程度可能であることがわかった。TOF-SIMS による分析でシニグリンの組織内分布を明確にするためには、表面分析で得られる複雑な試料の計測データ解析法およびデータの処理方法を今後確立する必要がある。

### 謝 辞

本研究は平成 24 年度島根大学生物資源科学部長裁量経費の補助を受けて行われた。LED 光源は東京大学大学院農学生命科学研究科の富士原和宏教授のオリジナルのアイデアによって開発されたことを記し謝意を表す。

### 文 献

- Aoyagi, S., Kuroda, K., Takama, R., Fukushima, K., Kayano, I., Mochizuki, S., and Yano, A. (2013) Evaluation of white radish sprouts growth influenced by magnetic fields using TOF-SIMS and MCR. *Surf. Interface Anal.* **45** : 264-267.
- Fujiwara, K. and Yano, A. (2011) Controllable spectrum artificial sunlight source system using LEDs with 32 different peak wavelengths of 385-910 nm. *Bioelectromagnetics* **32** : 243-252.
- Hori, H. (1966) Gravel culture of vegetables and ornamentals. 3. Nutrient Solution, Yokendo. Tokyo, Japan, pp. 60-79 (in Japanese).
- 中島佳史, 塩澤竜志, 齊藤貴江子, 谷晃. 光強度と光質が保持栽培中の葉付きワサビの有用成分に及ぼす影響. <http://kankyo.u-shizuoka-ken.ac.jp/2007HP/home.htm>
- Oguni, S., Kakibuchi, K., and Katayama, Y. (2005) Effects of environmental controls on the growth of wasabi (*Eutrema japonica* (Miq.) Koidz.) in a nutrient solution cultivation system. *Environ. Control Biol.* **43**(3): 181-191.