

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 *Wasabi japonica* Matsum. の辛み成分には食品としての重要な価値があり、例えば、日本では生魚食に欠かせない香辛料である。ワサビ栽培は、日射が弱く冷涼な谷間の、溪流や湧水が得られる場所で行われており、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、水、養分、培地、温湿度、光などの最適条件を決定する必要がある。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に影響を及ぼす光スペクトルを探求することとした。

2年目に入った本プロジェクトでは、まず、蛍光灯とLEDが放射する光スペクトルの違いがワサビ幼植物体のシニグリン濃度に及ぼす影響を研究した。次に、10日間および20日間暗黒で放置したワサビ幼植物体のシニグリン濃度を比較する実験を実施した。並行して、ワサビ成体葉柄横断面シニグリン分布のToF-SIMSによる分析手法の改良に取り組んだ。

方 法

—実験1 蛍光灯とLEDの放射スペクトルの違いがワサビ幼植物体のシニグリン濃度に及ぼす影響—

組織培養由来のワサビ幼植物体を供試した。葉面積が最大の葉以外の、すべての葉とそれらの葉に連続する葉柄を切除し、切除されたこれらをLED光照射前サンプルとした。照射前サンプルの生重を計測後 -60°C で冷凍保存した。50mlのプラスチック製試験管の中に最大面積葉とそれに連続する葉柄ならびに地下部から成る幼植物体（光照射サンプル）を入れて、30mlの養液（50% Enshi nutrient solution (Hori, 1966); $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (475mgL^{-1}), KNO_3 (405mgL^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (250mgL^{-1}), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (78mgL^{-1}), H_3BO_3 (3mgL^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22mgL^{-1}), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (2mgL^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.05mgL^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.02mgL^{-1}), Fe-EDTA (25mgL^{-1})) を加えた。

50ml試験管開口部の直径は30mmである。この試験管をLED光源の光照射口に差し込んだ。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で構成される (Fujiwara and Yano, 2011)。幼植物体に12時間暗期、12時間明期のサイクルで3日間光照射した。光照射口における分光光量子束密度 (SPFD) をスペクトロラジオメーターで測定した。この間、光源装置と幼植物体全体を設定温度 20°C のグロースチャンバー内に置いた。3日間のグロースチャンバー内の気温実測値は $19.2 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ であった。SPFDは晴天日の夕方に島根大学で実測した屋外の太陽光のSPFDを模擬した。光合成有効光量子束密度 (PPFD; 波長400-700nm) は $83 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。9本の10W直管蛍光灯を配備した人工気象器内でも光スペクトルを除いて同条件で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 $83 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ であった。人工気象器内の気温実測値は $18.5 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ であった。光照射後の幼植物体の地上部生重を計測した後、 -60°C で冷凍保存した。

シニグリンがミロシナーゼによって、揮発性のアリルイソチオシアネートに変化する (Grubb and Abel, 2006) と、HPLCで分析できないので、ミロシナーゼを不活性化する目的で (Lara-Lledó et al., 2012)、これらの試験管をオートクレーブで20min、 110°C 加熱、加圧した後、蒸留水で10倍質量に希釈し、ホモジナイザーで破碎した。その懸濁液1 ml中のシニグリン濃度をHPLCで測定した。生重100gあたりのシニグリン濃度を求めた。同一個体の光照射前後のシニグリン濃度を対の t 検定で比較した。

—実験2 10日間および20日間の暗黒処理がワサビ幼植物体のシニグリン濃度に及ぼす影響—

組織培養由来のワサビ幼植物体を供試した。幼植物体はバーミキュライトと培養液（50% Enshi nutrient solution）を入れた箱で馴化中であった。

2013年6月7日から6月17日まで設定温度 20°C のグロースチャンバー内にワサビ幼植物体を置いた。乾燥を防ぐためにグロースチャンバー内には1 Lの水を入れた容器を開栓して静置した。毎日一度、観察のためにわずかな時間グロースチャンバーの扉を開けた時以外は暗黒であった。給水および培養液の追供給はしなかった。10日間のグロースチャンバー内の気温は $20.3 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度は92% (s.d.=4.06) であった。6月17日に生重が0.2gを

超えるような単一または複数の葉およびそれらに連続する葉柄を個々の株毎に切り取って、試験管に入れた。ワサビ葉植物体が入った試験管は12本できた。オートクレーブで20min, 110°C加熱, 加圧した後, 直ちに-60°Cで冷凍保存した。

2013年6月27日から7月17日まで設定温度20°Cのグロースチャンバー内にワサビ幼植物体を置いた。10日間処理と同じ実験方法としたが, 7月5日に培養液を100ml, 7月16日に培養液を200ml追加した。20日間のグロースチャンバー内の気温は20.3±0.3°C, 相対湿度は93% (s.d.=3.72)であった。暗黒処理10日および20日のシニグリン濃度をt検定で比較した。

—実験3 ワサビ成体葉柄横断面シニグリン分布の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オートクレーブで20min, 110°C加熱, 加圧した後, 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 (Kodani et al., 2013)。その凍結組織片表面を包埋材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ガラス基板の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。一次イオン源に30keVのBi₃⁺を用いたToF-SIMSで試料を測定した。イオンドーズ量を10¹¹ions/cm²以下, 測定面積を500μm×500μmとした。

結果と考察

—実験1 蛍光灯とLEDの放射スペクトルの違いがワサビ幼植物体のシニグリン濃度に及ぼす影響—

蛍光灯, LEDいずれの光源の光を照射した場合でも, 同一個体のシニグリン濃度に光照射前後で有意な変化はなかった ($P>0.05$)。

—実験2 10日間および20日間の暗黒処理がワサビ幼植物体のシニグリン濃度に及ぼす影響—

10日間暗黒処理後のサンプルのシニグリン濃度と20日間暗黒処理後のサンプルのシニグリン濃度の平均値間に有意差はなかった ($P>0.05$)。

—実験3 ワサビ成体葉柄横断面シニグリン分布の

ToF-SIMSによる分析—

シニグリンのフラグメントと考えられる $m/z=174.9$ のピークが組織全面から検出された。維管束系にもシニグリンに関連するフラグメントが検出されたことから, シニグリンの植物体内輸送についても研究の余地があることが示唆された。

異なるスペクトルの光を照射してもシニグリン濃度に影響しなかったため, シニグリン生成を促進する光のスペクトルを見出すことはかなり難しい。連続暗黒で栽培しても, シニグリン濃度は容易に低下しない。今後, 光スペクトルと気温の変化を組み合わせた実験を実施する。

謝 辞

本研究は平成25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。

文 献

- 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.
- Grubb, C. D. and Abel S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science* 11(2):89-100.
- Hori, H. (1966) Gravel culture of vegetables and ornamentals. 3. Nutrient Solution, Yokendo. Tokyo, Japan, pp. 60-79 (in Japanese).
- Kodani, N., Iwai, H., Yano, A., Asao, T., and Aoyagi, S. (2013) Observation of biomolecules in plant tissue using ToF-SIMS. The 19th International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry.
- Lara-Lledó, M., Olaimat, A., and Holley, R. A. (2012) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on bologna sausages by an antimicrobial film containing mustard extract or sinigrin. *International Journal of Food Microbiology* 156:25-31.
- 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. *Environment Control in Biology* 43(3):181-191.