

概日リズムの制御を基盤原理とした収穫後青果物の 品質変化メカニズム解明とその利用

岐阜大学 応用生物科学部
タンマウオン マナスィカン

1. 研究の背景と目的

原核生物を含むほとんどすべての生物には概日リズムと呼ばれる約 24 時間周期で変動する生理現象が観察される¹⁾。植物において、外環境である昼夜や季節の変化に適応しながら生きていくために概日リズムは必須である²⁾。哺乳動物では体温、睡眠覚醒、ホルモンの分泌、摂食など、高等植物では胚軸の伸長、葉の就眠運動、気孔開閉、光合成などが知られている¹⁾。この概日リズムを生み出す生命機構を概日時計と呼び³⁾、入力系、中心振動体、出力系の 3 つのフレームワークに便宜的に区分される⁴⁾。温度や光などの外部信号を受け取ると入力系によって中心振動体に伝達され、中心振動体からの時間情報を基に出力系が決まった応答を誘導または制御する。近年の分子生物学の発展によりこの概日時計の実体は、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子の複雑なネットワークであることがわかってきた^{5, 6)}。植物概日時計は、*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* / *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)* 遺伝子と *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)* の 2 つの遺伝子がネガティブフィードバックループにより約 24 時間の周期を刻んでいる (Central loop)⁷⁾。これに加え、*PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR)*, *EARLY FLOWERIN (ELF)*, *LUX ARRHYTHMO (LUX)* の発現によって、Morning loop, Evening loop の計 3 つの発現フィードバックループ機構で、概日時計を形成している。光入力系によって概日時計は、光の強さに応じて葉緑体を移動させる葉緑体光定位運動、花芽形成への生育段階の切り替えなど多くの生理現象を制御している^{8, 9)}。

マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、光合成や細胞形成、二次代謝経路など、重要な遺伝子の発現が概日時計により調節されていることが判明した^{3, 10)}。概日時計と外部信号の関係を利用したものに植物工場が挙げられる。レタスの遺伝子発現リズムが植物工場では 22 時間周期であることや光の波長分布によって概日時計の周期そのものを調整できることも明らかになっており、これらの成果を生かし、植物工場ではより効率的に生産するための技術が開発されている¹¹⁾。また、長日植物であるシロイヌナズナより単離された *GIGANTEA (GI)* 遺伝子

は、光周性花成制御や概日リズム制御に関わる重要な鍵因子であることが明らかとなっていて、ポストハーベスト分野では、収穫後ブロッコリーにおいて GI 変異体では野生株と比較して黄化が抑制されたという報告がある¹²⁾。収穫後葉菜類において 12 時間毎の明暗サイクルによって、25 °C 貯蔵でも外観やクロロフィルが 10 °C 貯蔵と同等に維持されるという研究報告がある¹³⁾。このように概日リズムシステムを利用した研究報告はあるが、品質保持のメカニズムや光照射による時計遺伝子発現の変動、またこれらの関係については明らかになっていない。

アスコルビン酸は、光合成生物によって生成される水溶性抗酸化物質として様々な代謝系に関与している。葉菜類では収穫後に経時的に減少することが知られており、鮮度評価の指標の一つになる¹⁴⁾。しかし人間は体内でアスコルビン酸を生成できないため、食事から必要量を摂取する必要がある。このようにアスコルビン酸は人間栄養学としても重要である。

貯蔵中の光照射による品質と概日リズムの変動、またそれらの関係を明らかにすることによって、概日時計の制御を原理とした革新的品質保持法の開発が期待できる。そこで品質保持メカニズムの解明および関連の有無について検討した。本研究ではハウレンソウを水耕栽培し、栽培温度である 21 °C で 12 時間明期 12 時間暗期、24 時間暗期の二つの処理区で貯蔵した。このサンプルを用いて 4 時間毎に時計遺伝子、光受容体遺伝子、アスコルビン酸関連遺伝子について qRT-PCR を用いて測定を行い、発現解析を行った。

2. 研究の方法

2-1. 供試材料

供試材料には、研究室で水耕栽培したハウレンソウ (ASP02K) を用いた。栽培環境と同じ 21 °C に設定した室内で 2 日間貯蔵した。収穫前 24 時間から貯蔵終了までリズム解析のために 4 時間毎にサンプリングを実施した。アスコルビン酸測定のためのサンプルは、同様に収穫前 24 時間から貯蔵終了まで 12 時間毎に作製した。なお、収穫時刻は、6:00 am とした。

2-2. アスコルビン酸含量測定

(1) サンプリング方法

展開した葉のうち、内側から第5葉から第7葉の下半分を計2gになるよう使用した。アルミホイルで包み、液体窒素で凍結させた後、-80℃ (VT-208, NIHON FREEZER) で保管した。

(2) アスコルビン酸含量測定方法

アスコルビン酸含量測定は、Mazurek らの方法を参考にし、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC 法) によって行った¹⁵⁾。

測定には、UltiMate3000 (サーモフィッシャーサイエントフィック) を使用した。カラムは、Hydrosphere C18 (株式会社ワイエムシティ, 50 × 4.6 mm.D, 粒子径 3 μm) を用いた。移動相は、pH 2.2 の 50 mM リン酸緩衝液を用い、カラム温度は 35℃, 流量は 1.0 mL/min で測定した。

アスコルビン酸含量の算出では、標準液 (0, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL) のピーク面積で作成した検量線を用いて算出した。アスコルビン酸含量は、mg/100 g 新鮮重で表した。

2-3. 遺伝子発現量測定

(1) サンプリング方法

展開した葉のうち、内側から第5葉から第7葉の上半分を使用した。他の葉を傷つけないように葉をハサミで切り取り、それぞれアルミホイルで包み、液体窒素で凍結させた後、分析するまで -80℃ で保存した。

(2) RNA の抽出およびリアルタイム PCR による遺伝子発現解析

保存した試料を液体窒素と共に乳鉢・乳棒で粉末状に磨碎し、抽出試料とした。RNeasy® Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて、付属のマニュアルに従い RNA を抽出した。抽出した total RNA を鋳型とし、Primescript II 1st strand cDNA synthesis Kit (タカラバイオ株式会社) を用いた逆転写反応によって cDNA を合成した。CFX Connect™ Real-Time PCR System (Bio-Rad, USA) により、各サンプルのハウスキーピング遺伝子 So18S rRNA と標的遺伝子 (表 1) の発現量を測定した。リアルタイム PCR 解析用のプライマー配列は表 2 に示した。データ解析には、CFX Manager™ software (Bio-Rad, USA) を用いた。Livak らの方法を参考に $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて、収穫直後である 24 時間目を基準として遺伝子発現量の相対値を算出した¹⁶⁾。

2-4. データ解析

2.3 (2) より得られた相対遺伝子発現量を統計解析向けプログラミング言語、およびその開発実行環境である R コマンド (Windows 版, R4.1.2) を用いて、各遺伝子間の偏相関係数および偏相関係数行列を求めた。偏相関

係数とは、注目する変数以外の影響を取り除いた状態で 2 つの変数の間の相関を表す。偏相関係数を用いることで本来相関のないはずの変数が見かけ上相関があるように見える疑似相関を排除し、真の相関を見ることが出来る。時計遺伝子など複数の遺伝子が複雑に絡み合うため、偏相関行列を求め遺伝子発現が品質保持に及ぼす影響の考察に用いた。

表 1. 本研究で分析した遺伝子情報

Gene ID	Gene description	Accession number
<i>SoPHYA</i>	<i>Spinacia oleracea</i> phytochrome A	XM_021995200.1
<i>SoPHYB</i>	<i>Spinacia oleracea</i> phytochrome B-like	XM_022006854.1
<i>SoLHY</i>	<i>Spinacia oleracea</i> late elongated hypocotyl	XM_021990279.1
<i>SoPRR5</i>	<i>Spinacia oleracea</i> two-component response regulator-like apr3	XM_021990164.1
<i>SoELF3</i>	<i>Spinacia oleracea</i> early flowering 3	XM_021985848.1
<i>SoTOC1</i>	<i>Spinacia oleracea</i> timing of cab expression 1 (PRR1)	XM_022004963.1
<i>SoVTC2</i>	<i>Spinacia oleracea</i> GDP-L-galactose phosphorylase 1-like	XM_021995756
<i>SoGLDH</i>	<i>Spinacia oleracea</i> L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase	XM_021982567.1
<i>SoAPX</i>	<i>Spinacia oleracea</i> L-ascorbate peroxidase 3	XM_021982989.1
<i>So18S rRNA</i>	<i>Spinacia oleracea</i> 18S ribosomal RNA	Spo14194

表 2. リアルタイム PCR 用プライマー配列

Gene name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>SoPHYA</i>	ACAACCTACCCATAATCCAACACAC	CTGAAGTGAAGTTGATCAGTGAGAA
<i>SoPHYB</i>	GCTACAGATATACCTCAGGCGTC	AAGAGGCTGCTGATGACGTTTC
<i>SoLHY</i>	CACCATCATCACCGTCTTCTTC	AACTAAGGAAGAATTGAGCGCAG
<i>SoPRR5</i>	CAAGAAGCCTCGACCTCTG	TGTGCAGATTGAGGAGCAAGA
<i>SoELF3</i>	CAAGGATTGTTTCATCGCGTGG	TCCAGCACTTGCATCGAGAA
<i>SoTOC1</i>	CTTGTAAGCCATTGCGGAC	TATTCTTCCGCCAGGCCA
<i>SoVTC2</i>	TGCTTGCTCAACATGGCT	TGGAGGTGGTGTGATGGTAGC
<i>SoGLDH</i>	GCAGGAGCTTGTAGAGCACA	GGACGGCTCCACCTTGATAC
<i>SoAPX</i>	CGATCTTCGCGCTCTCATCT	CGTCTTCGCGCAATAAGTCC
<i>So18S rRNA</i>	GATTCCGACGAACAACCTGCG	AAGTAACATCCGCCGATCCC

3. 研究内容

3-1. アスコルビン酸含量

総アスコルビン酸含量の経時変化を図 1 に示した。12L/12D 貯蔵において、貯蔵開始から 24 時間後に収穫直後から約 50% に減少した。一方同時刻において 24D 貯蔵は、60% 以上減少していた。

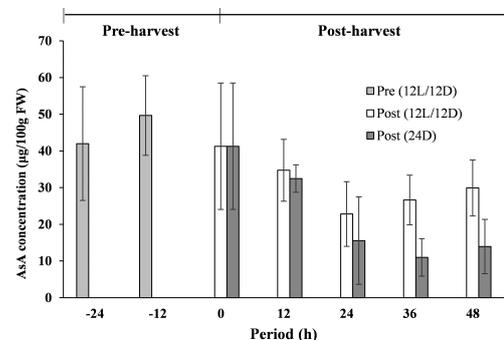


Fig. 1 Changes in ascorbic acid concentration during pre-harvest (cultivation) and post-harvest (storage) of spinach under 21℃. 0 is the time of harvesting spinach samples, and (-) indicates period (h) before harvesting.

3-2. 相対遺伝子発現量

図 2-4 には栽培中 24 時間, 貯蔵中 48 時間の光受容体遺伝子 (*SoPHYA*, *SoPHYB*), 時計遺伝子 (*SoLHY*, *SoPRR5*, *SoPIF3*, *SoTOC1*), アスコルビン酸代謝関連遺伝子 (*SoGLDH*, *SoVTC2*, *SoAPX*) の相対遺伝子発現量の経時変化を示した。

光受容体遺伝子の発現において, *SoPHYA* は栽培中 6:00 から緩やかに減少し, 18:00 に急増した。その後は緩やかに増加した。貯蔵中 12L/12D では緩やかな減少傾向が見られた。貯蔵中 24D では, 12L/12D と比較し発現量が増加していた (図 2A)。 *SoPHYB* は栽培中横ばいであった。12L/12D は暗期の間減少が確認できた。24D では貯蔵開始直後から減少し横ばいになった (図 2B)。 *SoPHYA* は暗所で蓄積され, *SoPHYB* は光に合わせて増減していることが分かった。

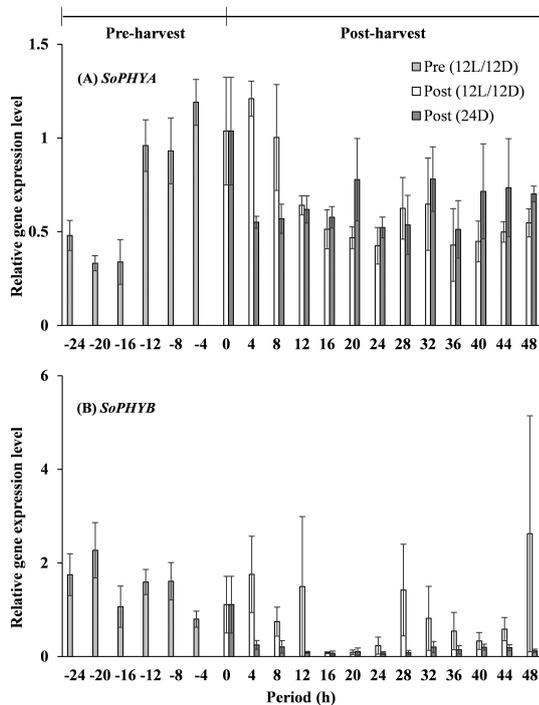


Fig. 2 Changes in expression level of photoreceptor-relating genes during pre-harvest (cultivation) and post-harvest (storage). 0 is the time of harvesting spinach samples, and (-) indicates period (h) before harvesting.

時計遺伝子発現において, 朝方位相遺伝子 *SoLHY* は栽培中, 明期が始まる 6:00 にピークを迎え明期が終わる 12 時間後に最も発現量が小さくなった。貯蔵中においては 12L/12D では, ピーク時における発現量の低下が見られたものの同様の傾向を示した。24D では収穫直後にピークを迎え経時的に減少した。貯蔵 12 時間後以降は横ばいになった (図 3A)。昼方位相遺伝子 *SoPRR5* は栽培中, 明期開始から 4 時間後である 10:00 にピークを迎え, その 12 時間後に最も相対遺伝子発現量が減少した。12L/12D, 24D において共に栽培中と同様のリズム

でピークを迎えた (図 3B)。ただし, 24D においては暗期における発現量の減少は小さくなっていた。夕方位相遺伝子 *SoPIF3* は栽培中, 暗期開始 18:00 に最も増加した。12L/12D では貯蔵 4 時間後にピークとなり, その 12 時間後まで減少した (図 3C)。24D では, 収穫直後から貯蔵終了まで横ばいになっていた。 *SoTOC1* は栽培中 18:00 にピークを示し, それ以降減少した。12L/12D 貯蔵中は 4 時間後から増加し以降横ばいになった。24D では, 増加傾向が見られた (図 3D)。

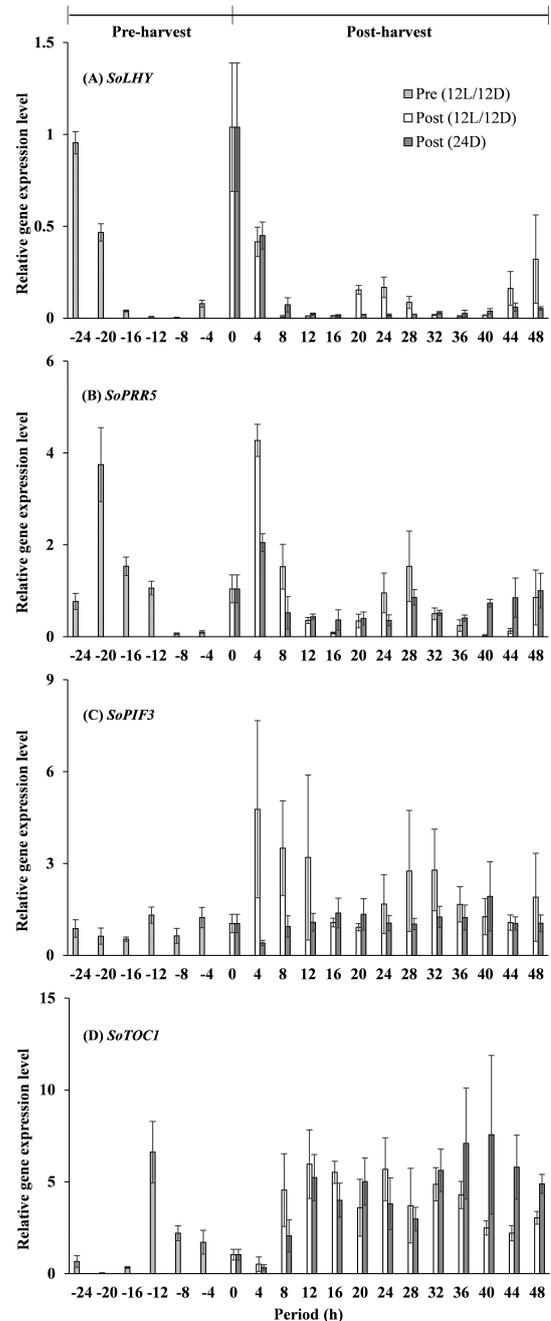


Fig. 3 Changes in expression level of clock genes during pre-harvest (cultivation) and post-harvest (storage). 0 is the time of harvesting spinach samples, and (-) indicates period (h) before harvesting.

アスコルビン酸代謝関連遺伝子において、アスコルビン酸生成遺伝子 *SoVTC2* は、12L/12D では栽培中を含め約 24 時間周期でピークが確認できた (図 4A)。24D では収穫 4 時間後に大きく発現量が減少し、その後は横ばいになった。*SoGLDH* は、栽培中 18:00 に最大値を取り、貯蔵中は 12L/12D では貯蔵 32 時間後と 48 時間後に増加が確認できたが、24D では貯蔵中横ばいになった (図 4B)。また、アスコルビン酸を電子供与体として活性酸素を消去する酵素をコードする *SoAPX* は栽培中、経時的に増加が見られた。どちらの貯蔵区でも発現量は減少し、12L/12D は貯蔵 12 時間後で、24D では貯蔵 4 時間後で横ばいになった (図 4C)。

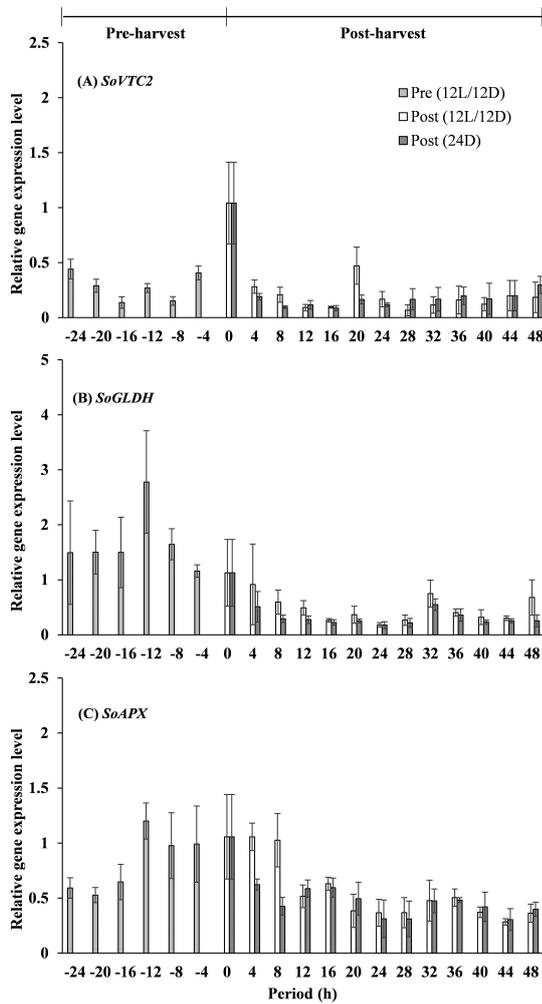


Fig. 4 Changes in expression level of ascorbic acid metabolism-related genes during pre-harvest (cultivation) and post-harvest (storage). 0 is the time of harvesting spinach samples, and (-) indicates period (h) before harvesting.

3-3. 偏相関係数

各遺伝子間の偏相関係数を図 5 に表し、その結果をネットワークモデルにより図を示した (図 6)。ネットワーク

パターンが光存在下の栽培中および 12L/12D、光が存在しない 24D では大きく変化していた。アスコルビン酸生成で働く *SoVTC2* は、栽培期間および貯蔵期間で時計遺伝子との相関がみられた。また光存在下の栽培中および 12L/12D では朝方位相遺伝子 *SoLHY* が共通して相関があった。栽培期間と貯蔵期間で比較したところ、後者では *SoLHY* と *SoPRR5* の強い相関がみられた。

4. 研究から得た結論・考察

アスコルビン酸量は、12L/12D 貯蔵区で多く、24D 貯蔵区で小さくなっていった。アスコルビン酸含有量は、鮮度の指標である。このことから、貯蔵中も光照射により減少を抑制することで、鮮度が維持されていると考えられる。過去の研究においても、収穫後明所で貯蔵したホウレンソウは暗所で貯蔵したものよりアスコルビン酸含量の減少が抑制された^{17, 18)}。本研究でも同様の結果が得られた。また Liu らによると 12L/12D は 24D よりクロロフィルを保持できた¹³⁾。これらから貯蔵中の光処理は品質維持に有効であることが示唆された。

	VTC2	APX	GLDH	PHYB	PHYA	TOC1	PIF3	PRR5	LHY
VTC2	1.00	0.34	-0.21	-0.05	0.37	-0.15	0.32	-0.05	0.78
APX		1.00	0.39	-0.14	0.78	0.57	0.37	-0.40	-0.10
GLDH			1.00	0.41	0.13	0.64	0.19	-0.01	-0.22
PHYB				1.00	-0.35	-0.02	-0.15	0.52	0.21
PHYA					1.00	0.48	0.63	-0.60	-0.09
TOC1						1.00	0.52	-0.30	-0.40
PIF3							1.00	-0.24	0.08
PRR5								1.00	0.17
LHY									1.00

	VTC2	APX	GLDH	PHYB	PHYA	TOC1	PIF3	PRR5	LHY
VTC2	1.00	0.07	0.18	-0.32	0.14	-0.43	-0.26	0.31	0.47
APX		1.00	0.39	0.08	0.78	0.00	0.38	0.67	0.19
GLDH			1.00	0.26	0.46	-0.30	0.10	0.45	0.26
PHYB				1.00	0.31	0.06	0.60	0.15	0.08
PHYA					1.00	-0.06	0.59	0.77	0.35
TOC1						1.00	0.45	-0.26	-0.28
PIF3							1.00	0.43	0.14
PRR5								1.00	0.66
LHY									1.00

	VTC2	APX	GLDH	PHYB	PHYA	TOC1	PIF3	PRR5	LHY
VTC2	1.00	-0.28	0.05	-0.05	0.22	-0.01	-0.18	0.41	0.10
APX		1.00	0.26	0.02	0.06	-0.08	-0.11	0.13	0.31
GLDH			1.00	0.44	0.03	-0.05	-0.15	0.32	0.38
PHYB				1.00	-0.01	-0.06	0.13	0.48	0.58
PHYA					1.00	-0.02	0.42	0.04	-0.14
TOC1						1.00	0.34	-0.45	-0.47
PIF3							1.00	-0.36	-0.41
PRR5								1.00	0.83
LHY									1.00

Fig. 5 Partial correlation coefficient of relative gene expression in spinach during (A) cultivation (pre-harvest), (B) storage (post-harvest) under 12 h light/ 12 h dark condition, and (C) storage under 24 h constant dark condition.

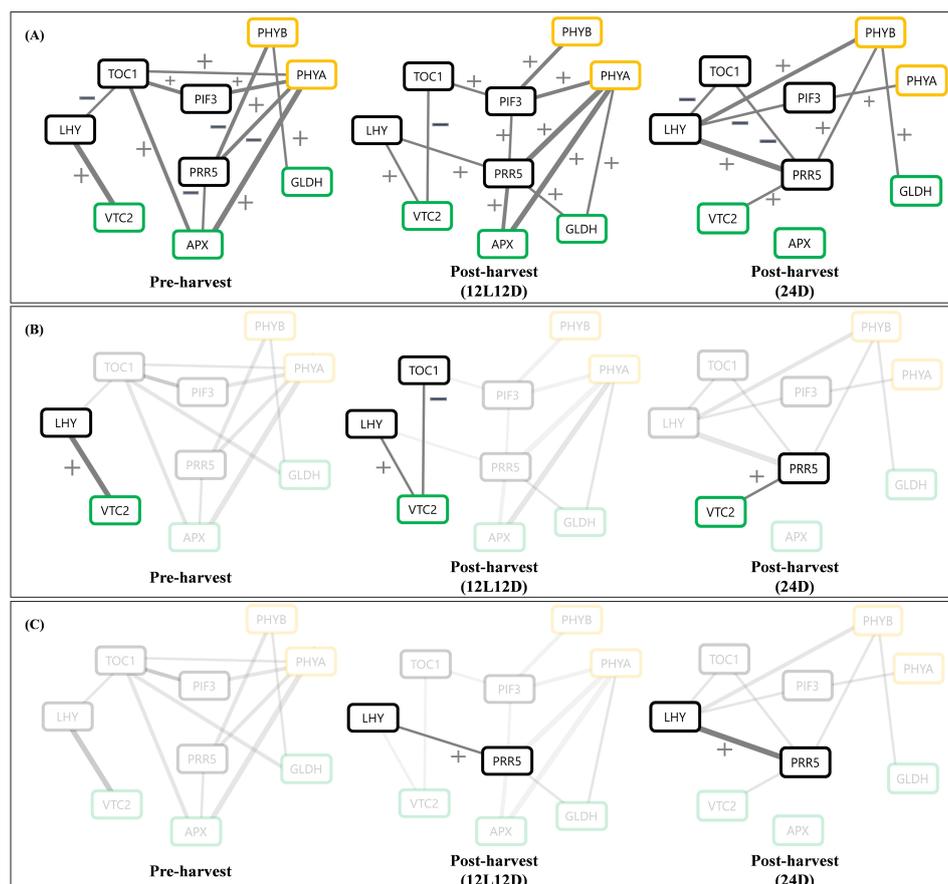


Fig.6 Network model of gene expression relationship observed under different storage conditions based on the partial correlation coefficient of relative gene expression in spinach; (A) all genes, (B) between clock genes and *VTC2*, and (C) among clock genes.

偏相関係数から得られたネットワークモデルより、光が存在する栽培中と 12L/12D、光が存在しない 24D の二つのグループではネットワークパターンが大きく変化していた。

アスコルビン酸の合成経路の律速段階で働く *VTC2* の発現は光応答性を示すと報告されている^{19, 20, 21, 22}。しかしながら本研究において、*SoVTC2* と光受容体はいずれの条件においても弱い相関であった。一方でモデル植物のシロイヌナズナでは、*VTC2* が光周期の開始時にピークを示し概日リズムに対する応答性が示唆されている²⁰。

本研究では、栽培中では *SoLHY*、12L/12D 貯蔵区では *SoLHY*、*SoTOC1*、24D 貯蔵区では *SoPRR5* に相関がみられた。*SoVTC2* と強い相関を持つのはいずれも時計遺伝子であり、概日時計の実体である時計遺伝子がアスコルビン酸代謝を制御するという考えを支持する結果になった。光存在下の栽培中、12L/12D 貯蔵区では *SoVTC2* と *SoLHY* の相関が共通してみられることより、時計遺伝子の中でもハウレンソウにおいては、*SoLHY* がアスコルビン酸量のコントロールに関与することが考えられる。また栽培期間と貯蔵期間で比較した際、後者ではと

もに時計遺伝子である *SoLHY* と *SoPRR5* の相関が強くなっていった。この二つの遺伝子は乾燥ストレス応答を制御している²³。栽培期間で見られなかった相関が貯蔵期間で見られるようになった理由として、収穫後は栽培時と異なり根から自由に水分を得られないことが挙げられる。

本研究より貯蔵時において *LHY* および *PRR5* がアスコルビン酸合成のコントロールに関与すると考えられる。ただし偏相関係数は因果関係を示すものではないため、詳しい経路を明らかにするにはさらなる研究が必要である。

5. 残された問題、今後の課題

貯蔵中の光照射による、品質と概日リズムの変動、またそれらの関係を明らかにできれば、概日時計の制御を原理とした新しい品質保持法の開発への利用が期待できる。本研究では、貯蔵中の光照射により、*SoLHY* および *SoPRR5* が発現することによって品質が保持されると考えられる。今後はさらなるメカニズム解明および革新的品質保持技術の開発のため、異なる品目および貯蔵条件や他の品質評価やその関連遺伝子の分析を行う必要がある。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました公益財団法人東洋食品研究所 2020 年度研究助成ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- 1 水野猛; 山條貴史: 植物の概日時計と和時計 - 植物に内在する時計のしくみ. *日本農芸化学学会*. 2007, **55**(3), p. 174-181.
- 2 藤原すみれ: 高等植物の概日時計を支配する翻訳語制御と転写制御機構. *生化学*. 2013, **85**(12), p. 1086-1090.
- 3 福田弘和: 植物工場における概日時計の科学技術. *植物環境工学 (J.SHITA)*. 2018, **30**(1), p. 20-27.
- 4 中道範人; 水野猛: 植物の生物時計 - 時計関連遺伝子と時計機構研究の新展開. *化学と生物*. 2006, **44**(5), p. 295-304.
- 5 大原隆之; 佐竹暁子: 植物の体内時計 - 柔軟な位相調節と代謝・成長の最適化. *日本物理学会誌*. 2017, **72**(12), p. 878-881.
- 6 Harmer, S. L.; The circadian system in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2009, **60**, p. 357-377.
- 7 Haydon, M. J.; Bell, L. J.; Webb, A. A.: Interactions between plant circadian clocks and solute transport. *J. Exp.Bot.* 2011, **62**, p. 2333-2348.
- 8 Barak, S.; Tobin, E. M.; Andronis, C.; Sugano, S.; Green, R. M.: All in good time: the Arabidopsis circadian clock. *Trends Plant Sci.* 2000, **5**, p. 517-522.
- 9 Johansson, M.; Staiger, D.: Time to flower: interplay between photoperiod and the circadian clock. *J. Exp.Bot.* 2015, **66**, p. 719-730.
- 10 Harmer, S. L.; Hogenesch, J. B.; Strume, M.; Chang, H. S.; Han, B.; Zhu, T.: Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science*. 2000, **290**, p. 2120-2113.
- 11 福田弘和: 生物が刻む時間に迫る: 植物が刻むリズムを植物工場に生かす. *JST news*. 2018, **3**, p. 10-11.
- 12 Thiruvengadam, M.; Shih, C. F.; Yang, C. H.: Expression of an antisense *Brassica oleracea* GIGANTEA (BoGI) gene in transgenic broccoli causes delayed flowering, leaf senescence, and post-harvest yellowing retardation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2015, **33**, p. 1499-1509.
- 13 Liu, J. D.; Goodspeed, D.; Sheng, Z.: Keeping the rhythm: light/dark cycles during postharvest storage preserve the tissue integrity and nutritional content of leafy plants. *BMC Plant Biol.* 2015, **15**(1), p. 1-9.
- 14 日坂弘行; 小倉長雄: 貯蔵中のホウレンソウ部位別のアスコルビン酸含量の変化. *日食工誌*. 1991, **38**(1), p. 41-43.
- 15 Mazurek, A.; Pankiewicz, U: Changes of dehydroascorbic acid content in relation to total content of vitamin C in selected fruits and vegetables. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2012, **11**(6), p. 169-177.
- 16 Livak, K. J.; Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*. 2001, **15**, p. 402-408.
- 17 Toledo, M. E. A.; Ueda, Y.; Shirosaki, T.: Changes of ascorbic acid contents in various market forms of spinach (*Spinach oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark conditions. *Sci. Rep. Grad. sch. Agric. & Biol. Sci., Osaka Pref. Univ.* 2003, **55**, p. 1-6.
- 18 Toledo, M. E. A.; Ueda, Y.; Imahori, Y.; Ayaki, M.: L-ascorbic acid metabolism in spinach (*Spinacia oleracea* L.) during postharvest storage in light and dark. *Postharvest Biol. Technol.* 2003, **28**(1), p. 47-57.
- 19 石川孝博: 植物のアスコルビン酸生合成研究の現状. *ビタミン*. 2020, **94** (8), p. 438-442.
- 20 Dowdle, J.; Ishikawa, T.; Gatzek, S.; Rolinski, S.; Smirnoff, N.: Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal*. 2007, **52**(4), p. 673-689.
- 21 Yabuta, Y.; Mieda, T.; Rapolu, M.; Nakamura, A.; Motoki, T.; Murata, T.; Yoshimura, K.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S.: Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 2007, **58**(10), p. 2661-2671.
- 22 Yoshimura, K.; Nakane, T.; Kume, S.; Shiomi, Y.; Maruta, T.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S.: Transient expression analysis revealed the importance of *VTC2* expression level in light/dark regulation of ascorbate biosynthesis in Arabidopsis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2014, **78**, p. 60-66.

-
- 23 Nakamichi, N.: The transcriptional network in the Arabidopsis circadian clock system. *Genes*. 2020, **11**(11), p. 1284.