

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14643

研究課題名(和文) NMRメタボロミクスによる畑作物の省力化育種・栽培技術開発のための基盤的研究

研究課題名(英文) Application of NMR-based metabolomics to the development of marker-assisted breeding and new cultivation technique

研究代表者

関山 恭代 (SEKIYAMA, Yasuyo)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：60342804

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)：本課題では、NMRメタボロミクスを活用して病害発生がない初期生育の時期や器官部位における代謝マーカーを探索し、新たな育種・栽培技術の開発に資する基盤情報を蓄積することを目的とした。解析対象は我が国の基幹畑作物であるジャガイモおよびテンサイとした。ジャガイモについては、複葉中のクエン酸とギ酸の量比(クエン酸量/ギ酸量)を算出することによって、健全圃場およびそうか病汚染圃場の差異を精度よく検出できることを明らかにした。また、テンサイについては、定植後の生育初期(病原菌接種前)において、抵抗性弱品種と中以上の品種の間でGABAとグルタミン含量に違いがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A better understanding of the plant metabolism response to environmental stresses, including pathogen infections, can help us understand plant physiology, which is crucial for the future applications of plant metabolomics in plant breeding and development of new cultivation techniques. In this study, we report the NMR-based metabolic profiling of field-grown leaves for a subset of potato and sugar beet genotypes, which are the major field crops in Japan. Common scab is one of the most serious soil-borne diseases of potato tubers in the world. At first, we clarified that ratio of foliar citrate to formate could be a marker for differentiating between normal and artificial field infested with common scab. Cercospora leaf spot (CLS), which is caused by the fungus *Cercospora beticola* Sacc., is one of the most serious leaf diseases for sugar beet (*Beta vulgaris* L.) worldwide. In our sugar beet field trial, GABA and Gln roughly differentiate susceptible genotypes from resistant genotypes.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：NMR メタボロミクス ジャガイモ テンサイ そうか病 褐斑病 代謝マーカー 育種・栽培技術

1. 研究開始当初の背景

従来、農作物が有する病害抵抗性を識別するためには、圃場において罹病を伴う栽培試験を行い、罹病度合いを比較する手法が取られてきた。しかしこの手法は、長期間の栽培試験を反復して行うため多大な労力を要する。そこで、QTL (量的形質座, 病害虫抵抗性や収量性など農業上重要な形質を支配することが多い) 解析を通じたDNA マーカーの開発が行われているものの、遺伝解析が困難な高次倍数体作物やゲノム情報の整備が不十分な作物では、十分なマーカーの開発が行われているとは言えず、新たな切り口からのブレイクスルーが求められる。申請者らはこれまで、核磁気共鳴 (NMR) 法に基づくメタボローム解析 (NMRメタボロミクス) を圃場栽培のジャガイモの解析に適用し、健全な葉の代謝マーカーを用いた疫病抵抗性の判別が可能であることを示し、当該代謝マーカーの簡易定量による抵抗性の診断法を開発した[1,2]。以上の背景から、農学におけるメタボロミクスの有用性に着目し、病害抵抗性や収穫物の品質等に関わる代謝マーカーを開発すれば、育種・栽培における画期的な省力化技術の開発や新たな研究分野の開拓に繋がると考えた。

2. 研究の目的

本課題では、NMRメタボロミクスを活用した新たな育種・栽培技術の開発の可能性について、従来の作物メタボロミクスでは殆ど試みられてこなかった代謝マーカーの活用に着目し、病害発生がない初期生育の時期や器官部位における代謝マーカーを探索し、病害抵抗性に関する簡易診断や品質予測のための技術開発に資する基盤情報を蓄積することを目的とした。解析対象は我が国の基幹畑作物であるジャガイモおよびテンサイとした。それぞれ着目した病害と背景を以下に述べる。

(1) ジャガイモそうか病について

ジャガイモそうか病は、収穫物である地下部の塊茎 (イモ) に病斑を生じる病害で (図1), 発生により生食および加工用途としての商品価値を著しく損なうが、経済性に見合う有効な防除法は未だない。また、そうか病は地下部にのみ病徴が現れるため、塊茎を収穫するまでその被害状況を把握することは困難である。そこで、健全圃場およびそうか病汚染圃場で栽培したジャガイモを対象に、通常、病徴の判断に使用されない地上部に着目してNMRメタボロミクスを実施し、抵抗性の強弱や、収穫前の早期のイモの品質予測や栽培環境の改善の指標となり得る代謝変動および代謝マーカーを明らかにすることを目的とした。

(2) テンサイ褐斑病について

テンサイ褐斑病はテンサイの生産地において最も深刻な被害をもたらす病害であり、根重および根中糖含量の低下を引き起こす。抵

抗性は圃場にて病原菌の接種後、葉に生じた病斑の進展度合いを継時的に観測することで評価する。本研究により病原菌の接種前あるいは定植前の幼苗の葉を用いて代謝マーカーによる検定が可能になれば、労力とコストの大幅な削減が可能となる。そこで、病原菌接種前の健全葉、あるいは圃場に定植する前の幼苗を中心にNMRメタボロミクスを実施し、抵抗性の強弱と相関する代謝変動および代謝マーカーを明らかにすることを目的とした。

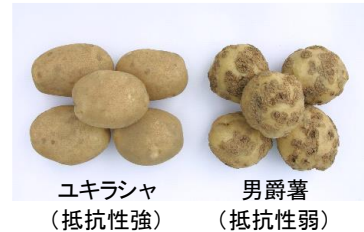


図1. ジャガイモそうか病の症状

3. 研究の方法

(1) ジャガイモの栽培試験およびNMR計測
北海道農業研究センターの実験圃場において、そうか病汚染圃場および健全圃場のそれぞれで抵抗性および遺伝的背景が異なるジャガイモ8品種・系統 (表1) の栽培試験を行った。塊茎形成初期の段階である7月上旬に、各品種・系統についてそれぞれ1ブロックにつき3株ずつ、主茎上部に位置する複葉を採取した。

表1. 解析に用いたジャガイモの品種・系統

| 品種・系統 | そうか病抵抗性 |
|--------|---------|
| 男爵薯 | 弱 |
| はるか | 弱 |
| こがね丸 | 弱 |
| 北海104号 | 弱 |
| さんじゅう丸 | 中 |
| 勝系31号 | 強 |
| スノーマーチ | 強 |
| ユキラシャ | 極強 |

その凍結乾燥物について、微粉碎後に 10 mg を採取し、重水素化リン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.0) 700 μ L を加えて 5 分間、90°C で振とう抽出した。遠心分離して得られた上澄みを NMR 試料管にいれ、温度 298 K にて、Bruker 社製 AVANCE500 (クライオプローブ付き) を用いて NMR スペクトルを測定した。

(2) テンサイの栽培試験およびNMR計測

ジャガイモと同じく北海道農業研究センターの実験圃場において、褐斑病抵抗性および遺伝的背景が異なるテンサイ12品種・系統 (表2) を栽培し、接種試験による罹病度の調査を行った。

幼苗期 (5月中旬, 播種後約1か月) は、3 個体の地上部を採取して1試料とし、各品種・

系統について3反復ずつの試料を用意した。圃場に定植後の生育初期(6月中旬, 菌接種前), 根部肥大期(7月中旬, 菌接種後), 病害進展期(8月上旬)については, 各品種・系統についてそれぞれ1ブロックにつき1株ずつ成葉を採取し, 3ブロックからのサンプリングを行うことで3反復とした。テンサイの葉の凍結乾燥物について, ジャガイモと同様にNMRスペクトルを計測した。

表2. 解析に用いたテンサイの品種・系統

| 品種・系統 | 褐斑病抵抗性 |
|------------|--------|
| レミエル | 弱 |
| かちまる | 弱 |
| えぞまる | 弱 |
| アーベント | 弱 |
| モノヒカリ | 中 |
| アンジー | 強 |
| スタウト | 強 |
| クリスター | 強 |
| ラテール | 強 |
| 北海みつぼし | 強 |
| リボルタ | 強 |
| NK-310mm-O | 強 |

4. 研究成果

(1) ジャガイモそうか病関連代謝マーカーの探索

はじめに, 複葉の ¹H-NMR スペクトルを用いた成分プロファイリングを行った。¹H-NMR スペクトルを用いて, 健全圃場およびそうか病菌汚染圃場のそれぞれで栽培したジャガイモ作物間での部分最小二乗 (PLS) 判別分析を行った。その結果, 抵抗性の強弱によらず, 汚染圃場で生育したジャガイモの複葉では健全圃場で生育したものよりもギ酸含量が上昇し, クエン酸含量が減少することを見出した。

そうか病汚染圃場で栽培したジャガイモの複葉抽出物にはギ酸 (δ 8.46 ppm) が多く, 健全圃場で栽培したジャガイモの葉にはクエン酸 (δ 2.54 ppm) が多い傾向が見られた。さらに, 複葉抽出物のクエン酸とギ酸の量比 (クエン酸量/ギ酸量) を算出することによって, 健全圃場及びそうか病汚染圃場の差異を精度よく検出できる可能性が示唆された (図2)。これらの有機酸は市販の酵素キットによる簡易定量が可能であり, 仮に市販の自動比色分析装置をマーカーの定量に活用できる場合, 検定規模の大幅な拡大が可能となる (関山ら, 「ジャガイモ作物体の生育状態診断方法」特願 2015-109720, 2015年5月29日)。

高品質な農作物に対する消費者や加工事業者の高いニーズを適えながら生産者の収益性も高めていくためには, 栽培する圃場の特性やそれに由来する作物の生育状態を総合的に評価し, その結果を適切な品種と栽培技術を組み合わせた効率的な生産に反映す

ることが重要である。本成果では, 地上部である複葉に含まれる上記有機酸の量を指標とすることで, 塊茎を掘り起こすことなくそうか病菌の影響の有無を評価できる可能性が示唆された。

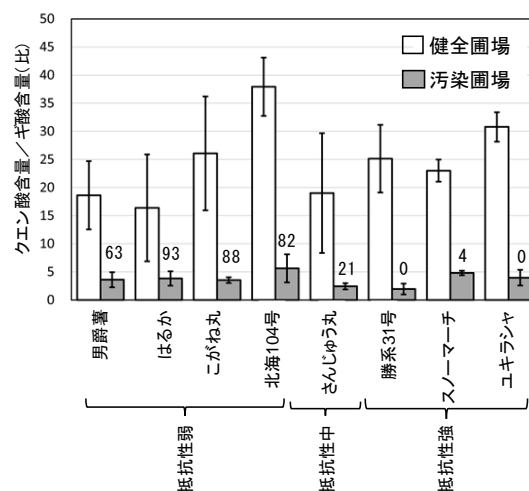


図 2. 健全圃場およびそうか病汚染圃場で, 抵抗性の異なるジャガイモ品種・系統を栽培したときの複葉中のクエン酸とギ酸の量比。数値は汚染圃場で栽培したときの発病塊茎率(%)

(2) テンサイ褐斑病関連代謝マーカーの探索

はじめに, 葉の ¹H-NMR スペクトルを用いて主成分分析(PCA)を行った。テンサイの葉の代謝プロファイルは, 抵抗性の強弱によらず生育段階によって大きく異なり, 生育後半ではコリンの減少および, ベタインと糖類の増加が見られた (図3)。このことは, 褐斑病抵抗性代謝マーカーが, あるとしても生育段階に応じて変化する可能性を示唆する。

次に, 生育段階ごとに, 発病度を応答変数として PLS 回帰分析を行ったところ, 発病度と相関の大きい代謝物は見出せなかった。そこで, 用いた品種・系統を抵抗性の弱いグループと中程度以上のグループに分け, すべての NMR 変数について Welch の検定 (有意水準 5%) により有意差を調べた。その結果, 定植後病原菌の接種前の生育初期の葉において, GABA とグルタミン含量の違いが見られた (図4)。

続いて, テンサイの代謝変化について年間差の検証と, さらなる省力化が可能な圃場に定植する前の幼苗を用いた抵抗性の識別について検討した。解析には, 2015年および2016年の栽培試験で得られた2年分の試料を用いた。生育段階による代謝プロファイルの違いについては, 生育が進むにつれてコリンが減少し, 糖類とベタインが増加する傾向が2年間を通じて見られた。幼苗における抵抗性の識別については, モノヒカリ (抵抗性中程度) を除いた11品種の ¹H-NMR スペクトルを用いて OPLS 判別分析を行った。2年とも共通して4月播種の試料で抵抗性の強弱でグループが分かれる傾向が見られた。播

種時期を変えるとこの傾向はみられないことから、幼苗を用いた抵抗性の識別には、播種時期や生育環境が重要である可能性が示唆された。以上本成果では、接種試験を行う前、あるいは圃場に定植する前の幼苗の段階で、代謝マーカーにより抵抗性が識別できる可能性が示唆された (Sekiyama et al., *Metabolites*, 2016)。引き続き、未同定のスペクトル領域について解析を進めている。

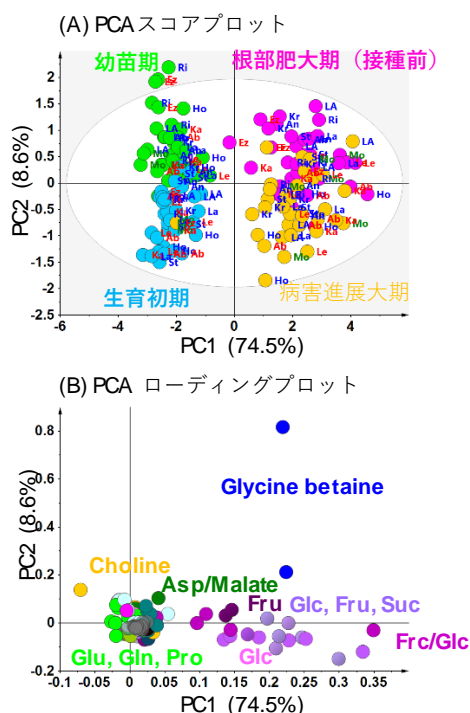


図3 テンサイの葉の ¹H-NMR スペクトルを用いた主成分分析のスコアプロット (A) およびローディングプロット (B)

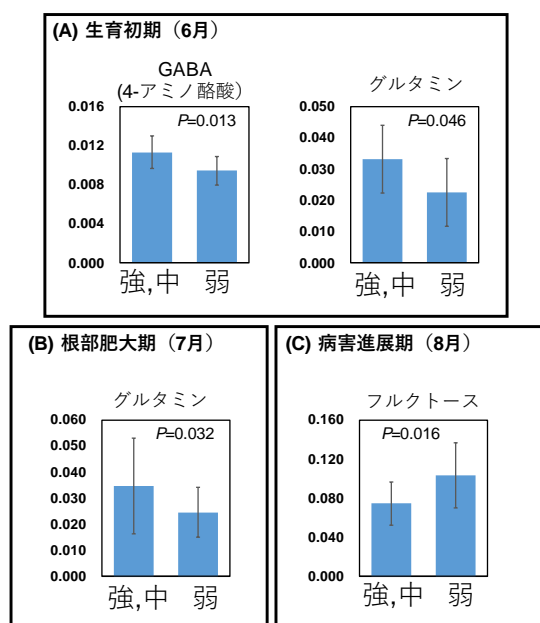


図4 抵抗性が中程度以上と弱い品種との間で有意差が見られる代謝物の相対強度比

<引用文献>

[1] 関山 (他 4 名), ジャガイモ疫病抵抗性品種系統の識別方法, 特許第 6150406 号
 [2] Tomita et al. (他 8 名), *Magnetic Resonance in Chemistry*, Vol. 55, 2017, pp. 120-127

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① 関山恭代, 池田成志, 富田理, *NMR による実践的な農業メタボロミクス研究に向けて 生産現場から生まれる成分多様性を見るために*, 化学と生物, 査読有, Vol. 55, No. 6, 2017, pp. 392-399
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.392
- ② Yasuyo Sekiyama, Kazuyuki Okazaki, Seishi Ikeda and Jun Kikuchi, *NMR-based metabolic profiling of field-grown leaves from sugar beet plants harbouring different resistance levels of Cercospora leaf spot disease*, *Metabolites*, 査読有, Vol. 7, 2017, 4
DOI: 10.3390/metabo7010004
- ③ 関山恭代, 池田成志, 富田理 *農業・食品産業現場における NMR メタボロミクスの利用と今後の展望*, バイオインダストリー (シーエムシー出版), 査読無, Vol. 32, No. 10, 2015, pp. 10-16

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 池田成志, 関山恭代, *農業・食品分野における微生物科学とメタボロミクスの連携の可能性について*, 第 11 回メタボロームシンポジウム (招待講演), 2017, ホテル阪急エキスポパーク (大阪府吹田市)
- ② 関山恭代, *NMR データから見る農と食のサイエンス*, JASIS2018 (招待講演), 2017, 幕張メッセ国際展示場 (千葉県千葉市)
- ③ 関山恭代, *農業・食品産業現場でのメタボロミクスの活用に向けて*, 次世代農業最前線セミナー (招待講演), 2017, とちぎプラザ (北海道帯広市)
- ④ 関山恭代 *メタボロミクスによる作物・農産物の成分多様性に影響する環境要因の評価と農学・食品科学のパラダイムシフト*, 自然共生型農業研究シンポジウム 2016 (招待講演), 2016, とちぎプラザ (北海道帯広市)
- ⑤ Yasuyo Sekiyama, Kazuyuki Okazaki, Seishi Ikeda and Jun Kikuchi, *NMR-based metabolic profiling of field-grown leaves from sugar beet plants harbouring different resistance levels to Cercospora leaf spot disease*, 12th International Conference of the Metabolomics Society, 2016, (Dublin, Ireland)
- ⑥ 関山恭代, *農業・食品研究における NMR メタボロミクスの利用*, 農業食料工学会

食料・食品工学部会シンポジウム（招待講演），2016，東京都立食品技術センター（東京都千代田区）

- ⑦ Satoru Tomita, Kenji Asano, Seishi Ikeda, Jun Kikuchi, Eisuke Chikayama, Hirohshi Ono, Akira Kobayashi, Yuki O. Kobayashi, and Yasuyo Sekiyama, NMR-based metabolic profiling of potato leaves for the identification of potential metabolic indicators in relation to common scab resistance in potato tubers, 11th International Conference of the Metabolomics Society, 2015, (San Francisco, USA)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 1 件）

名称：ジャガイモ作物体の生育状態診断方法
発明者：関山恭代，富田 理，小野裕嗣，池田成志，浅野賢治，小林 晃，小林有紀
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-109720
出願年月日：2015 年 5 月 29 日
国内外の別：国内

- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関山 恭代 (SEKIYAMA, Yasuyo)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員
研究者番号：60342804

(2) 研究分担者

岡崎 和之 (OKAZAKI, Kazuyuki)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・主任研究員
研究者番号：90549239

(3) 連携研究者

池田 成志 (IKEDA, Seishi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・上級研究員
研究者番号：20396609