

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05553

研究課題名（和文）バイオスティミュラント資材の統合オミクス評価技術の開発

研究課題名（英文）Evaluation method for biostimulant materials by metabolomics-based approach

研究代表者

伊達 康博（DATE, Yasuhiro）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・高度分析研究センター・主任研究員

研究者番号：60585785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ビッグデータ時代に即して多サンプルをハイスループットに解析できるよう前処理・計測条件・分析プロトコル等の最適化および解析プログラムの整備を行い、作業の効率化を図った。また、コマツナを用いた評価試験では、部分的最小二乗法に基づく判別分析等の解析手法を用いることで、海藻系バイオスティミュラント資材を使用した試験区と対照区における代謝プロファイルの違いを識別することが可能であった。さらに統合解析の結果から、コマツナの収量等と相関する物質群を網羅的にスクリーニングすることができ、本手法を用いることで海藻系バイオスティミュラント資材を評価することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したBS資材の評価技術を利用して様々な作物やBS資材を評価していくことで、作物の収量や品質向上、ストレス耐性等に資する可能性のあるバイオマーカーに関する情報の蓄積が見込まれる。そうして得られた情報の蓄積が、将来的にはバイオマーカーに基づいた現場レベルで実効性のある評価系の確立に繋がり、基礎的な作用機序の解明や適切な使用条件等の明確化に貢献することが期待できる。このことは、実際の農業現場において、農家のニーズ等に適したBS資材を選定するためのガイドラインを提供することに繋がり、農業従事者におけるBS資材の利用促進ならびに産業界における市場規模の拡大に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study focused on an evaluation method for biostimulant (BS) materials by metabolomics-based approach. To this end, the study performed improvements and optimizations of the methods such as preprocessing, measurement conditions, and analytical protocols for high-throughput analyses of a huge number of samples in the era of Big Data. In addition, the discriminant analysis-based methods such as partial least squares-discriminant analysis enabled to capture some metabolomic characteristics induced by BS materials. Moreover, the integrated approach showed some correlations between substances and plant weights. Therefore, this approach should be useful to evaluate the BS materials originated from seaweeds.

研究分野：メタボロミクス、バイオインフォマティクス

キーワード：バイオスティミュラント メタボロミクス

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農業が抱える多様な問題(人口増加、地球温暖化、砂漠化等による食糧問題、日本ではさらに高齢化や担い手不足等の労働力に起因する問題等)を解決するためには、農作業の効率化や生産性の向上、付加価値の創出等が重要である。その解決策の一つとして、植物の生産ポテンシャルを引き出すことが可能なバイオスティミュラント(BS)資材が注目を集めていた。BSとは、肥料のような栄養源とは異なる生理作用により、非生物的ストレスへの耐性を強化し、作物の収量や品質を改善することができる物質や微生物等のことで、多種多様なものがある。その効能も多種多様であるが、BS資材の多くはその作用機序が不明瞭であり、栽培条件や栽培環境等に依存して効き目にバラつきが生じてしまい、現場レベルでは全く効果が見られない、といったことも少なからず起こり得る。この理由としては、作物の生理状態や内的な生理環境、生育段階における代謝活性等に対して、選択したBS資材が適していない、あるいは散布する濃度やタイミング等がマッチしていない、等が理由として挙げられる。こうした問題を解決するために、散布すべき資材の種類、濃度およびタイミング等の使用条件を決めるための評価系の構築や目安となるバイオマーカーの特定が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、オミクス技術を活用することで、作物の収量や品質向上、ストレス耐性等々に資する可能性のある物質等を特定し、BS資材を評価することのできる方法論の確立を目指した。本研究で開発する統合オミクス評価技術は、ラボスケールでの試験において、モデルケースを想定した限定的なプロトタイプの完成を到達地点として定めており、研究対象作物・BS資材としてコマツナおよび海藻由来BS資材をそれぞれ選定し、人工気象器内にて栽培環境をコントロールできる条件下で研究開発を行った。

また、近年のコンピュータ関連技術の急速な発展に伴うデータ量の爆発的な増加に起因して、データハンドリングやデータマイニング技術等についてもパラダイムシフトが起こりつつある。このような状況下において、測定データの取得や、得られた測定データの処理・解析についてもビッグデータ化・ハイスループット化されていく傾向にあり、BS資材の評価技術に関する研究においてもビッグデータ時代に即した研究開発が必要であると考えた。そこで本研究では、多サンプルの測定データをハイスループットに取得できるよう各種抽出方法や計測条件、分析プロトコル等の最適化について検討するとともに、ルーティンで解析できるような解析手法についてはオートメーション化・プログラム化・ツール化等について検討することで、サンプルの抽出から計測、データ処理、および解析結果のアウトプットまでの一連の流れを迅速に実行できるような計測・解析環境の構築も目指した。

3. 研究の方法

本研究では手法の開発を行うにあたり、植物の表現型と密接に関わりのある代謝物が最も重要であると考え、オミクス技術の中でも特にメタボロミクスに着目し、核磁気共鳴(NMR)によるメタボローム解析を中心に研究を実施した。本研究ではNMR装置を採用しているが、特に国内では質量分析装置を用いたメタボロミクス研究が盛んである。それぞれの装置に利点および欠点があり、NMR装置は質量分析装置と比べて感度が低いという欠点があるものの、ある程度の濃度で存在している代謝物についてはバイアスなく網羅的かつ定量的に検出することが可能であるため、植物に含まれる1次代謝物の分析に適していると考え、本研究ではNMRメタボロミクスを採用するに至った。

NMRメタボロミクスを実施するにあたり、質量分析装置と比べて感度の低いNMR装置の弱点を少しでも補うために、(1)可能な限りたくさんの代謝物を検出できるようにすること、および(2)ビッグデータ時代に即してより効率的かつハイスループットに多サンプルを測定できるようにすること、の2点を両立させるため、使用するサンプル量に関する最適化や、サンプルの破碎・抽出方法に関する検討等、前処理条件の検討・最適化を行った。合わせて、NMRによる測定方法の検討・最適化についても実施し、作業の効率化を図った。また、得られたデータの解析方法についても同様に、主成分分析(principal component analysis, PCA)や階層的クラスタ分析、相関ヒートマップ等のような、データセットの特徴を概観したり、ルーティンで実施したりする一般的な手法については、定型業務として実行できるよう解析プログラムの整備も行った。

4. 研究成果

本研究では海藻系BS資材を対象として、ラボスケールでの試験を実施し、目的・方法の項目で記述したように、ビッグデータ時代に即して多サンプルをハイスループットに解析できるように前処理・計測条件・分析プロトコル等の最適化および解析プログラムの整備を行い、作業の効率化を図った。結果的に、本研究で用いたコマツナ試料を対象としたNMRメタボロミクスに関しては、一週間で数百サンプル程度の測定データが得られる分析システムを構築することができ

た。また、in-house の解析プログラムを開発し(参考文献1) 本研究において利用することで、NMR 装置による測定で得られたスペクトルデータの解析プログラムへの読み込み、NMR スペクトルの処理や数値化・マトリクス化等の半自動的なデータ前処理、階層的あるいは非階層的クラスター分析、PCA、相関ヒートマップ、部分的最小二乗法に基づく判別分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 機械学習の一種であるランダムフォレストやサポートベクターマシン等による判別・回帰分析、半自動的な代謝物アノテーション、といった一連の作業をシームレスに実行することができ、データの前処理や解析に係る労力を削減し、作業を効率化することが可能であった。

コマツナを用いた海藻系 BS 資材の評価試験では、海藻系 BS 資材を使用した試験区と使用していない対照区を設定し、乾燥ストレス等のいくつかの非生物学的ストレス条件に対する代謝応答性についてそれぞれ比較・解析を実施した。いずれの試験条件においても、前述した分析および解析システムを利用してサンプルの測定およびデータ処理を行い、最初に PCA 等の手法を用いて解析に用いたデータセットの特徴を概観し、その後続く解析の指針を立てた。最終的に、PLS-DA 等の判別分析関連の解析手法を用いることで、BS 資材を使用した試験区と対照区における代謝プロファイルの違いを識別することが可能であり、いずれの試験条件においても代謝物組成のパターンが試験区と対照区で異なっていることが明らかとなった(図1)。また、収量等の表現型等データを含めた統合解析の結果から、コマツナの収量等と関連する物質群を網羅的にスクリーニングすることが可能であった。収量等と関連する物質群については、非生物学的ストレスの種類や強度、条件等で大きく異なっていたことから、研究実施期間内には残念ながらバイオマーカーの特定には至らなかったが、今後更なる詳細な実験および解析を行うことで、作物の収量や品質向上、ストレス耐性等々に資するバイオマーカーを特定することができるものと見込んでいる。

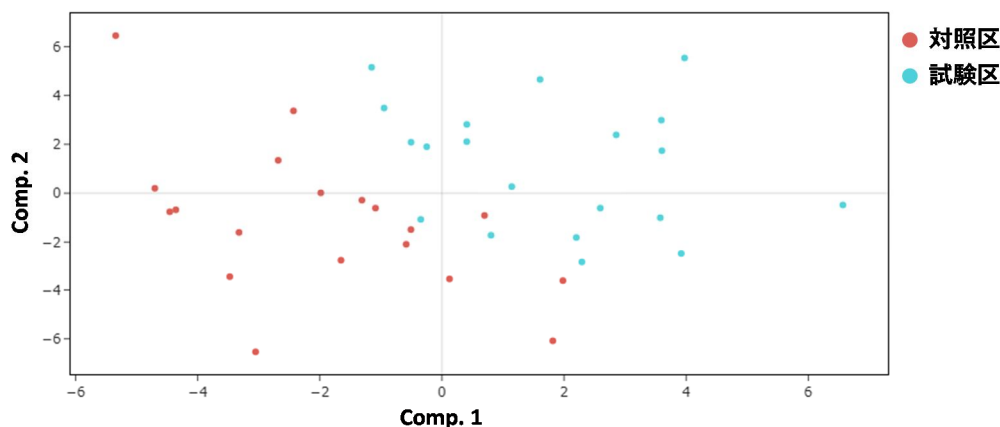


図1 PLS-DA による解析結果 代謝物プロファイルの判別分析

以上の結果から、本研究で構築・最適化した計測・分析・解析環境や手法を利用することで、コマツナに含まれる代謝物プロファイルや、含有成分の組成・パターンから、海藻系 BS 資材を比較的ハイスループットに評価・識別することが可能であった。今後はより詳細な試験や解析を実施することで、作物の収量や品質向上、ストレス耐性等々に資するバイオマーカーを特定していきたいと考えている。また、本研究ではラボスケールで試験を実施したが、今後は実用化を視野に入れて圃場レベルでの実証試験や、コマツナ以外の作物、あるいは海藻系以外の BS 資材への適用可能性について検証を行う必要があると考えている。

<参考文献>

1. 伊藤研悟, 伊達康博, 川村隆浩, 大城正孝, 江口尚, 小野裕嗣, リモート NMR 分光分析供用システムの開発と農研機構統合データベース及び AI 研究用スーパーコンピュータ「紫峰」との連携, 農研機構研究報告, 第 13 号, 2023, 3 - 22

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Date Yasuhiro, Ishikawa Chiaki, Umeda Makoto, Tarumoto Yusuke, Okubo Megumi, Tamura Yasuaki, Ono Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Sugarcane Metabolome Compositional Stability in Pretreatment Processes for NMR Measurements	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 862 ~ 862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12090862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------