

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月3日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658063

研究課題名（和文）生物フォトン利用によるダイズ植物体で湿害早期検出法の開発

研究課題名（英文）Application of biophoton for the detection in the early stage of flooding injury in soybean

研究代表者

小松 節子（KOMATSU SETSUKO）

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所畑作物研究領域・上席研究員

研究者番号：90355751

研究成果の概要（和文）：わが国の水田転換畑におけるダイズの栽培では、湿害が発生し生産が不安定となるので、湿害を早期に発見し回避する技術が必要である。ダイズは出芽期の数日間の冠水ストレスで根に障害が発生しその後の生育遅延を招くため、湿害発生を早期に検出することが重要である。一方、生物フォトンは、乾燥、塩、高温・低温、病原菌等に基づく、呼吸阻害や膜阻害等で放射される生命活動に付随した発光である。そこで、ダイズ植物体において土壌環境下で起こる湿害を地上部で簡便に検出するために、生物フォトン放射を利用する。

研究成果の概要（英文）：Flooding is a major problem for soybean because it reduces the growth and grain yield. Detection of biophoton emission can provide real-time characteristics of various biological samples from individual organisms to the cellular levels. To obtain better insight into the response mechanism of soybean seedlings under flooding stress, the measurement of biophoton emission is applied.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：湿害、ダイズ、生物フォトン、プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

我が国の畑作物で深刻な課題は、水田転換畑における耐湿性作物の栽培であるが複雑な農業形質であるため解決していない。ダイズの湿害を発生初期に回避することは生産性の安定・向上に不可欠である。本応募研究課題の代表者は、ダイズの出芽期における湿害発生機構の解明を目指し、包括的解析手法であるプロテオーム解析により生体防御応答に関与するパーオキシダーゼを含むタンパク質群を検出した。さらに、トランスクリプトーム解析によりリポキシゲナーゼを含む遺伝子群が湿害により顕著に変動することを明らかにした。一方、遺伝子発現に由来

する酵素発現等により放射される極微弱な光（生物フォトン）放射について、生体防御応答で発現するリポキシゲナーゼやパーオキシダーゼなどの酵素に由来することは明らかである。生物フォトンは非破壊で継続的に観察できることから、分光分析によりタンパク質の発現状況がリアルタイムで観察可能である。そこで、ダイズ植物体が土壌環境下で起こる湿害の早期検出に生物フォトン放射を応用する。

2. 研究の目的

ダイズの湿害を生育初期に回避することは、水田転換畑でのダイズの栽培を可能にし、生

産性の安定・向上に不可欠である。一方、生物光子は非破壊で継続的に観察できることから、分光分析によりタンパク質の発現状況がリアルタイムで観察可能である。そこで、ダイズ湿害の植物体での早期検出に、生物光子放射を応用することを目的とする。本研究により、ダイズの湿害発生のモニターシステムを開発し、湿害回避のダイズの栽培・育種技術の向上に貢献する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料と処理

ダイズ品種エンレイの種子をシードリングケース内の砂に播種、2日後あるいは3日後に冠水処理（砂の上4 cm）し、経時的に根、胚軸、葉を採取する。乾燥処理は、播種2日目から水を除去する。無処理のダイズを対照とする。全ての実験において、3回以上の反復実験を行う。

(2) プロテオミクス解析

処理後、タンパク質抽出液を用いて破碎後、遠心分離により粗タンパク質画分を抽出し、トリクロロ酢酸・アセトンで精製濃縮する。タンパク質を二次元電気泳動法で分離し、画像解析ソフトを用いてタンパク質スポットの発現量を解析する。処理により変動するタンパク質群を、質量分析計で同定する。

(3) 候補タンパク質および遺伝子の解析

処理により変動する候補タンパク質群のアミノ酸配列を利用して特異的プライマーを作成し、定量リアルタイムPCRにより、RNAレベルでの発現解析を行う。さらに、タンパク質を電気泳動後膜に転写し、特異的抗体を用いて、抗原抗体反応を行うことにより、タンパク質レベルでの発現解析を行う。

(4) 生物光子の測定方法

生物光子は、光子カウンター（C1230 photon counter + R208 photomultiplier tube、浜松フォトニクス）を用いて、25°Cで2時間測定する。

①タンパク質抽出液（in vitro）での測定：タンパク質抽出液に0.056%過酸化水素水を添加し、光子カウンターにて測定する。

②植物体（in vivo）での測定：植物の各器官を採取し、0.5 mM ルミノール液を塗布し、光子カウンターにて測定する。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

①ダイズ中での生物光子の測定条件の設定

ダイズにおける生物光子測定条件を検討した結果、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ酵素活性測定条件を利用できるこ

とが明らかになった。そこで、in vitro の系における最適条件を設定するために、過酸化水素濃度の条件を検討した結果、生物光子の放射量は過酸化水素の濃度に依存し、0.056%過酸化水素をタンパク質抽出液へ添加することが最適であった（図1）。

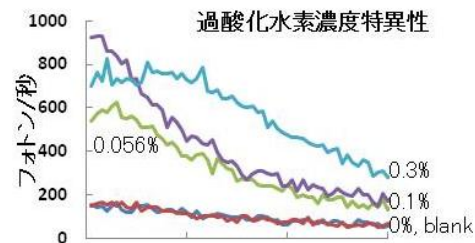


図1 ダイズの生物光子測定：播種3日目でストレス処理し、5日目のダイズ根からタンパク質を抽出し、過酸化水素処理後、生物光子を測定した。横軸は過酸化水素処理後の測定時間を示し、最長2時間まで測定した。図中の数字は過酸化水素の濃度を示す。

②生物光子放射におけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼの役割

ダイズを播種後3日目で経時的に冠水および乾燥処理し根を採取した。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ酵素活性は冠水処理で低下し乾燥処理で増加する。さらに抗原抗体反応の結果、ダイズのアスコルビン酸ペルオキシダーゼのうち30 kDa タンパク質は冠水処理で減少し、45 kDa タンパク質は乾燥処理で増加する（図2）

次にダイズを播種3日目で経時的に冠水、乾燥、塩および重金属等で5日間処理し根を採取し、ダイズ根のタンパク質抽出液に対して生物光子を測定した。生物光子の発生量は乾燥処理では対照より低く、冠水処理では対照より高く、冠水ストレスを他のストレスと識別できた（図3）。

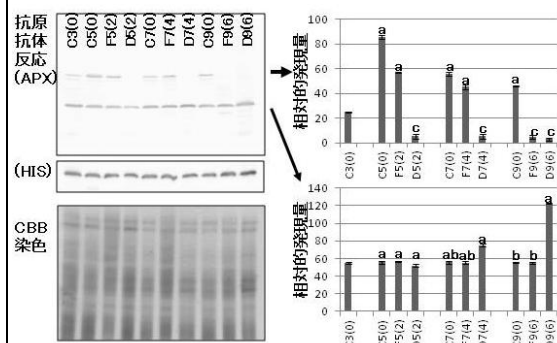


図2 ダイズにおけるアスコルビン酸ペルオキシダーゼのストレス特異性：左上は抗アスコルビン酸ペルオキシダーゼ抗体（APX）と抗ヒストン抗体（HIS）を用いての抗原抗体反応の結果を示す。右は相対的タンパク質発現量の測定結果を示す。Cは対照、Fは冠水、Dは乾燥を示す。実験は3回の反復実験の平均±SEを示す。

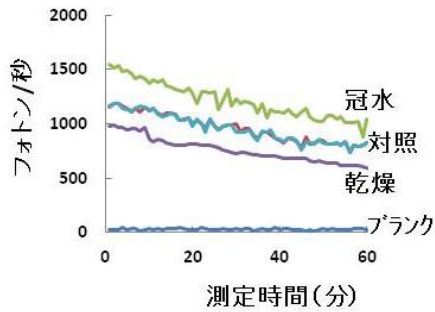


図3 ダイズにおける生物フォトン発生に対するストレス特異性：播種後3日目で乾燥および冠水処理7日間のダイズ根からタンパク質を抽出し、in vitro 生物フォトン測定した。

③非破壊系での生物フォトンの測定

ダイズを播種3日目で冠水処理し、5日目で根を採取し、タンパク質抽出液 (in vitro) および植物体 (in vivo) に対して生物フォトン測定した。タンパク質抽出液での測定の方が、生物フォトン放射量が多いが、非破壊条件下でも生物フォトン測定できることが明らかとなった (図4)。

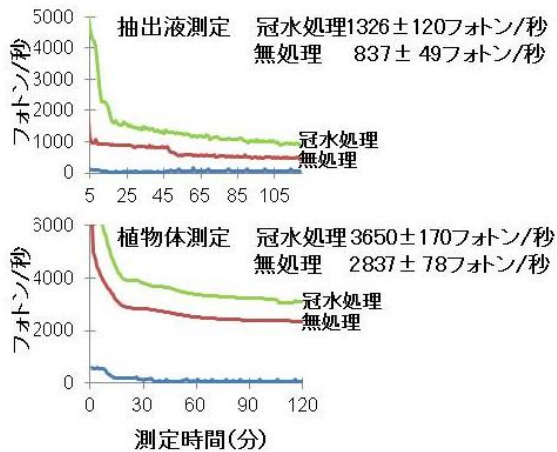


図4 冠水処理下のダイズ根における in vitro と in vivo での生物フォトン測定：冠水処理後5日目のダイズ根のタンパク質抽出液あるいは植物体に対して生物フォトン測定した。In vitro においてはタンパク質量、in vivo においては器官の面積あたりのフォトンを示す。3回の反復実験の平均±SEを示す。

④ダイズ植物体の各器官での生物フォトンの測定

播種後3日目で3日間冠水処理し、水除去後3日目のダイズ植物体を材料とした。各器官にルミノールを塗布し、フォトンカウンターを用いて各器官で放射される生物フォトン in vivo で測定した。その結果、湿害による生物フォトンの放射を地下部 (根) と同様に、地上部 (葉と胚軸) で有意に測定可能であった (図5)。

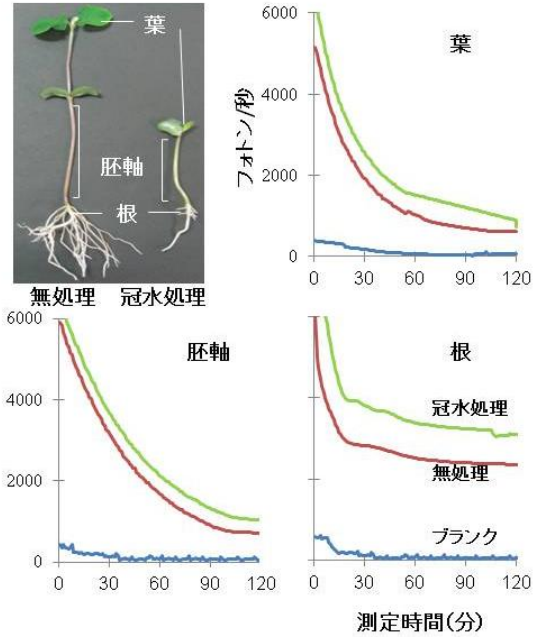


図5 冠水処理下のダイズにおける各器官の生物フォトン放射の in vivo 測定：無処理あるいは冠水処理後のダイズの根、胚軸および葉を用いて、生物フォトン in vivo で測定した。3回の反復実験の平均的結果を示す。測定時間はルミノール処理後の時間を示す。

⑤出芽期のダイズにおけるバイオフィトン発生の機構解析

出芽期のダイズにおける湿害を地上部 (子葉) で検出するために、生物フォトン照射を利用する目的で、根と子葉で共通に変動している因子を解析した。播種後2日目で2日間冠水処理し、コンピュータ断層撮影とエネルギー分散型X線分析を行った。その結果、冠水ストレスにより、シュウ酸カルシウムが減少し、カルシウム濃度が上昇することを明らかにした (図6)。

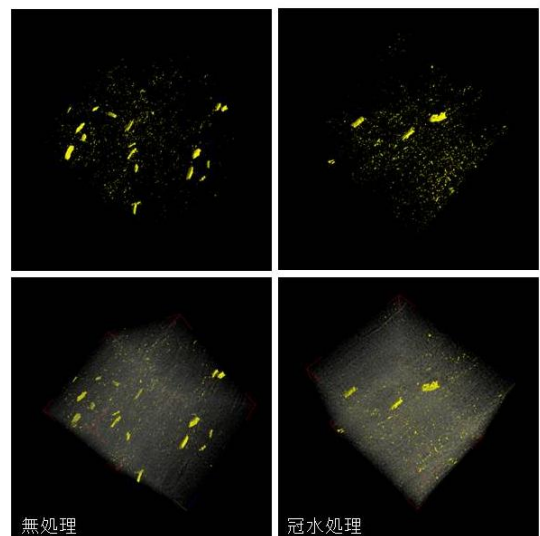


図6 ダイズ子葉のコンピュータ断層撮影

そこで、プロテオミクス解析を行った結果、カルシウムにより活性化される熱ショックタンパク質 70 が共通に誘導されていることが証明された (図 7)。さらに、熱ショックタンパク質で誘導される生物フォトンは、同様に検出された (図 8)。以上、湿害発生機構へのカルシウムの関与を示唆した。

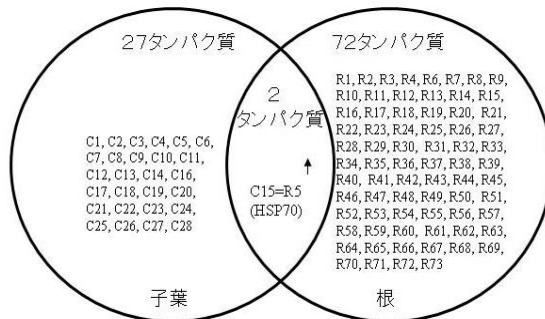


図 7 プロテオミクス解析により変動するタンパク質群

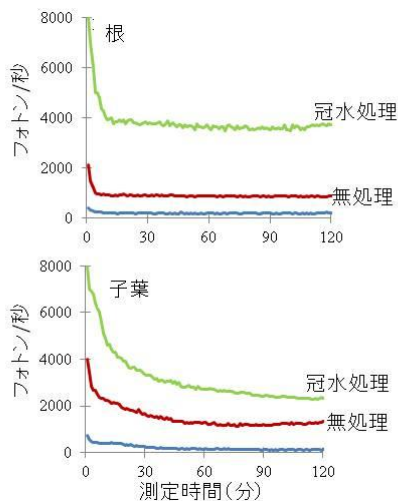


図 8 冠水下のダイズにおける生物フォトン測定

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ダイズの出芽期における生物フォトン発生を利用して、湿害発生の早期に非破壊系で地下部の湿害を地上部で検出する技術を開発した。この成果は論文として国際誌に発表すると同時に、国内外から招待講演や特別講演として講演依頼された。

(3) 今後の展望

①過酸化水素の代わりに、発光ダイオードで生じる紫外光を照射しそれを評価する系を開発することにより、屋外での利用も可能となる。

②本研究で検出した生物フォトンの変動はダイズで得られたもので、他の生物種について再現性を求めることにより、広く湿害発生を検出できるシステムに展開する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Komatsu Setsuko, Makino Takahiro, Hiroshi Yasue. Proteomic and biochemical analyses of the cotyledon and root of flooding-stresses soybean plants. 2013, PLOSONE, in press. <http://www.plosone.org/>

(2) Kausar Rehana, Hossain Zahed, Makino Takahiro, Komatsu Setsuko. Characterization of ascorbate peroxidase in soybean under flooding and drought stresses. Molecular Biology Reports, 2012, 39(12):10573-10579. doi:10.1007/s11033-012-1945-9.

(3) Khatoon Amana, Rehman Shafiq, Hiraga Susumu, Makino Takahiro, Komatsu Setsuko. Organ-specific proteomics analysis for identification of response mechanism in soybean seedlings under flooding stress. Journal of Proteomics, 2012, 75(18):5706-5723. doi:10.1016/j.jprot.2012.07.031.

(4) Hossain Zahed, Makino Takahiro, Komatsu Setsuko. Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. Journal of Proteomics, 2012, 75(13):4151-4164. doi:10.1016/j.jprot.2012.05.037.

[学会発表] (計 2 件)

(1) 小松節子, 作物のストレス耐性機構解明研究へのプロテオミクス技術の利用. 日本農薬学会第 38 回大会 (特別講演). 2013 年 3 月 15 日, 筑波大学 (つくば)

(2) 小松節子, Application of proteomics to investigate stress-induced proteins. Plant Abiotic Stress Tolerance II (招待講演). 2012 年 2 月 24 日, VetMed University (オーストリア・ウィーン)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 節子 (KOMATSU SETSUKO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究所畑作物研究領域・上席研究員
研究者番号: 90355751

(2) 研究分担者

無