

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580029

研究課題名(和文) 圃場環境操作実験およびNMRメタボロミクスによる水稻代謝応答の解析

研究課題名(英文) NMR-based metabolic profiling of rice grown under free air CO₂ enrichment, elevated water-soil temperature and low nitrogen

研究代表者

関山 恭代 (Yausuyo, Sekiyama)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・研究員

研究者番号：60342804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：圃場環境操作実験で栽培されたイネを対象にNMRメタボロミクスを実施し、気候変化がイネの代謝プロファイルにおよぼす影響を調べた。

コシヒカリでは、年により程度は異なるものの、幼穂形成期にCO₂濃度上昇による影響が見られ、糖類の組成変化が示唆された。低窒素区における代謝プロファイルの変化は穂揃期以降に現れ、登熟期では止葉の葉身および葉鞘、小穂の全てにおいて施肥の影響が認められた。タカナリはコシヒカリよりも環境変化による代謝への影響が小さく、穂揃期の止葉葉身においてわずかにCO₂濃度上昇による効果が見られ、施肥の影響は見られなかった。水温上昇の影響は、コシヒカリ、タカナリともに確認されなかった。

研究成果の概要(英文)： NMR-based metabolic profiling was performed on rice plants grown under free air CO₂ enrichment (FACE), elevated water-soil temperature (ET) and low nitrogen supply (LN). The effect of elevated CO₂ was observed in Koshihikari at the panicle initiation stage. The PCA loading analyses suggested that the sugar composition changed in response to the increase of CO₂. LN affected the amino acids, organic acid and sugar contents in Koshihikari after the heading stage. The effect of climate change in Takanari was smaller than Koshihikari. A modest changes in sugar composition was found in the leaf blade of Takanari at the heading stage. The effect of ET was not found in both Koshihikari and Takanari.

研究分野：分析化学

キーワード：メタボロミクス NMR 開放系大気CO₂増加(FACE) イネ

1. 研究開始当初の背景

今後予想される大気 CO₂ 濃度の上昇や温暖化は、作物の収量だけでなく品質にも大きな影響をおよぼす。これまでの研究から、このような気候変化がイネの光合成物質生産収量品質におよぼす影響とその機構が明らかにされつつあるとともに、影響の程度が品種や施肥条件によっても異なることがわかってきた[1-3]。これらはいずれも適応技術のシーズと考えられるため、その要因解明は喫緊の課題である。そのためには、遺伝子の転写・翻訳過程の変化から、形態・生理機能に至るまでの変化を明らかにする必要がある。

農業環境技術研究所が運営する開放系大気 CO₂ 増加 (Free air CO₂ enrichment, FACE) 実験施設は、開放系の屋外圃場で高 CO₂ 濃度環境を実現するもので、水温上昇との複合的な影響の解析も可能である。これまでに開放系大気 CO₂ 増加に対する遺伝子応答を調べた例はあるが、さらに下流の代謝の変化を捉えようとした試みはない。そこで本課題では、開放系圃場における環境操作実験で栽培されたイネを対象にメタボローム解析を実施し、今後予想される気候変化がイネの代謝プロファイルにおよぼす影響およびこれらの品種間差異を調べることにした。

2. 研究の目的

本課題では、核磁気共鳴 (NMR) 法によるイネ代謝物の網羅的解析 (メタボローム解析) を実施し、今後予想される気候変化がイネの代謝プロファイルにおよぼす影響を評価する。具体的には、FACE 実験施設において高 CO₂ 濃度、高水温下で栽培したイネについて、通常栽培との代謝プロファイルの違いを明らかにする。また、窒素施肥の違いがこれらにおよぼす影響も評価する。この解析を、気候変化による品質低下の程度が異なる2品種 (コシヒカリ、タカナリ) について行う。以上、気候変化に伴うイネの代謝変化および品種間差異を明らかにすることで、物質生産能および米の品質変化の予測や適応技術の開発に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

栽培およびサンプリング

FACE 実験施設 (つくばみらい市) では、水田の一角に差し渡し17 m の正八角形状に設置したチューブからCO₂ を放出し、正八角形区画内のCO₂ 濃度を周辺の外気よりも約200 ppm 高く (約590 ppm) 制御している。このCO₂ 濃度は、SRES シナリオ (Special Report on Emission Scenarios, ICPP2000) の経済成長社会シナリオにおいて、今世紀半ばに想定されるCO₂ 濃度に相当する。本課題では、圃場におけるCO₂ 濃度および水温の上昇がイネの代謝におよぼす影響を調べるために、表1に示すサンプリングを実施した。すなわち、CO₂ 濃度を増加させたFACE 区と対照区のそ

れぞれについて、温暖化を想定して水温をプラス2 上げた加温栽培区、窒素施肥を行わない低窒素区を設け、幼穂形成期 (7月上~中旬)、穂揃期 (8月上~中旬)、登熟期 (8月下旬) の3点でサンプリングを行った。主茎地上部をサンプリング後に直ちに液体窒素で凍結し、凍結乾燥した。凍結乾燥後の試料を部位ごとに分け、微粉碎し粉末試料を調製した。解析に供した部位を図1に示す。幼穂形成期の上位2葉、穂揃期および登熟期の止め葉と小穂について、2012年産試料を中心に解析を行った。

表1. サンプリング計画 (太字は、以降の図中で使用する実験区の略称)。圃場反復は4とした。

栽培区 栽培条件	FACE 区:F (高 CO ₂ 条件: CO ₂ 濃度約 590 ppm)	対照区:A (現在の大气 条件: CO ₂ 濃度 約 390 ppm)
通常栽培: NT (窒素施肥 8g/m ²)	主茎地上部 3反復	主茎地上部 3反復
加温栽培: ET (ヒーターを水没 させ、水温を通常栽 培区と比べて常に プラス2 に制御)	主茎地上部 3反復	主茎地上部 3反復
低窒素栽培: ON (窒素施肥を行わ ない)	主茎地上部 3反復	主茎地上部 3反復

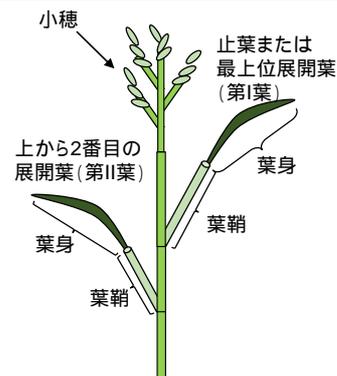


図1. メタボローム解析に供した部位

メタボローム解析

で調製した凍結乾燥粉末を重水素化溶媒で加熱抽出後、遠心分離した上澄を NMR 計測に供した。抽出溶媒には重水緩衝液または重メタノール緩衝液を使用し、水溶性代謝物およびメタノール可溶性代謝物のプロファイル調べた。代謝プロファイリングは、一次元 ¹H-NMR の計測および主成分分析 (PCA) を中心に行なった。

4. 研究成果

2012 年産試料の全スペクトルを使用した主成分分析では、環境条件の違いによるクラス形成は見られず、葉身、葉鞘、小穂といった部位の違いが最も大きく見られ、次いで

サンプリング時期や、最上位展開葉(第1葉)と第11葉といった葉齢ごとのクラス形成が認められた。これらのクラス形成には糖類の寄与がきく、次いで有機酸類の寄与が見られた。

コシヒカリでは、幼穂形成期における第11葉葉身の水溶性代謝物について、FACE区と対象区とでクラス形成する傾向が見られた(図2)。ローディングプロットの解析から、このクラス形成には糖類の組成変化の寄与が大きいことが示唆されたため、現在詳細な帰属を進めている。

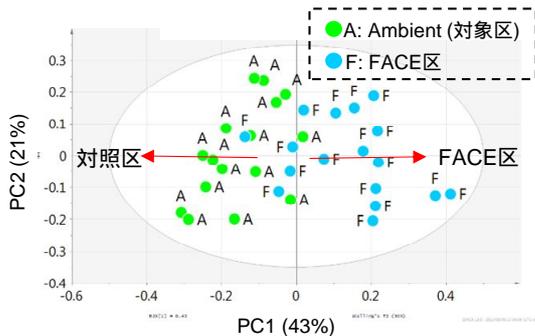


図2. コシヒカリ幼穂形成期(第11葉葉身)の重水緩衝液抽出物のPCAスコアプロット。

低窒素区における変化は穂揃期以降の水溶性代謝物に現れる傾向が見られた。穂揃期では止葉の葉鞘、登熟期では止葉の葉身および葉鞘、小穂の全てにおいて施肥の違いによる影響が確認できた。登熟期の止葉葉鞘のPCAスコアプロットおよびローディングプロットを図3に示す。

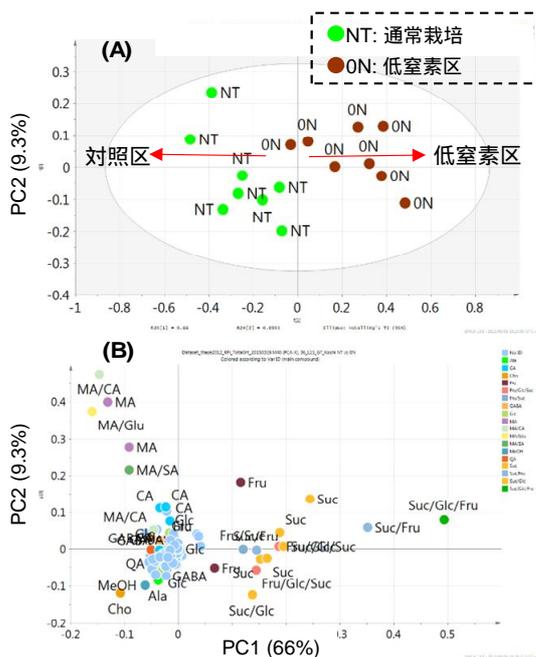


図3. コシヒカリ登熟期(止葉葉鞘)の重水緩衝液抽出物のPCAスコアプロット(A)およびローディングプロット(B)。

低窒素区では、通常栽培区と比べてリンゴ酸、クエン酸などの有機酸、GABA、アラニンなどのアミノ酸の割合が小さくなり、相対的にスクロース、グルコース、フルクトースなどの糖類の割合が大きくなること示唆された。葉身では葉鞘と類似した代謝プロファイルの変化が見られたが、小穂では糖類の組成変化が大きいことが示唆された。これらの糖類について、現在帰属を進めている。

タカナリはコシヒカリよりも環境変化による代謝への影響が小さく、穂揃期の止葉葉身において第二主成分(PC2)方向にわずかにFACEによる効果が見られた(図4)。コシヒカリと同様に、このクラス形成には糖類の組成変化の寄与が大きいことが示唆されたため、帰属を進めている。また、コシヒカリで見られたような施肥の影響は、タカナリでは確認できなかった。

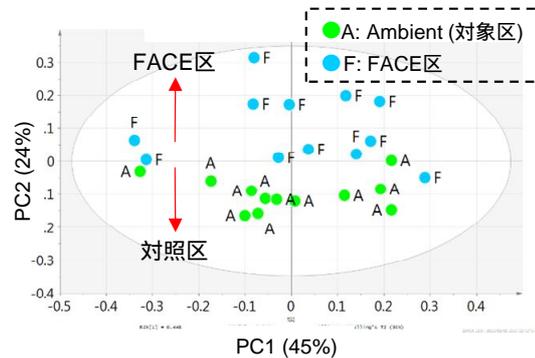


図4. タカナリ穂揃期(止葉葉身)の重水緩衝液抽出物のPCAスコアプロット。

メタノール抽出物のNMRスペクトルを用いた代謝プロファイリングでは、コシヒカリ、タカナリともに環境操作実験による変化は見出せなかった。

さらに、コシヒカリについては2011年産試料との比較を行った。2011年のコシヒカリでも、2012年と同様に幼穂形成期でFACE実験による代謝物プロファイルの変化が見られた。その効果は2012年よりも大きく、第1葉と第11葉の葉身および葉鞘の全てで効果が見られた。2011年産試料のPCAスコアプロットおよびローディングプロットを図5に示す。まず、対照区とFACE区でクラス形成する傾向が見られ、次いで部位の違い(葉身と葉鞘)によるクラス形成が見られた。FACE区ではスクロースの割合が多く、対象区ではグリセロ脂質の割合が多い傾向が見られた(雑誌論文にて報告)。従って、イネの代謝に対するCO₂濃度の影響は年度ごとに異なることが示唆された。今後も引き続き追跡調査を実施し、これらの差異と連動して変化する表現型(収量や品質等)を明らかにする必要がある。また、加温区については、2011年、2012年ともに代謝プロファイルへの影響は確認されなかった。

以上、本課題では気候変化がイネの代謝プロファイルにおよぼす影響を評価し、CO₂濃度

の上昇により変化する代謝物の一部や変化が見られる時期および部位、施肥の影響を明らかにした。一方で、外観に大きな差異をもたらす水温の上昇が、NMR で検出できる主要代謝物についてはほとんど影響を及ぼさないことも分かった。代謝変化の年次間差異については、2013 年試料を用いて引き続き調査を進めている。

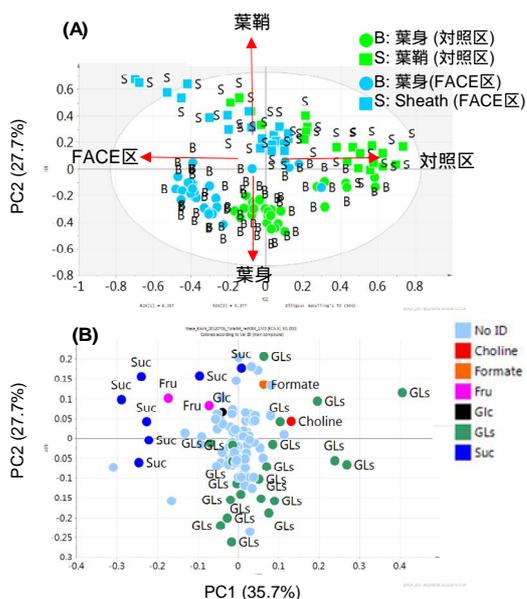


図 5. 2011 年産コシヒカリ幼穂形成期（第 I 葉と第 II 葉の葉身および葉鞘）の重メタノール緩衝液抽出物の PCA スコアプロット(A) およびローディングプロット(B)。

< 引用文献 >

森田, 日本作物学会紀事, 77 (1), 1-12 (2008).

若松ら, 日本作物学会紀事, 77 (4), 424-433 (2008).

Lafarage, T. *et al.*, (2011), *Crop Adaptation to Climate Change*, pp 298-313.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Seishi Ikeda, Takeshi Tokida, Hirofumi Nakamura, Hidemitsu Sakai, Yasuhiro Usui, Takashi Okubo, Kanako Tago, Kentaro Hayashi, Yasuyo Sekiyama, Hiroshi Ono, Satoru Tomita, Masahito Hayatsu, Toshihiro Hasegawa, Kiwamu Minamisawa, Characterization of leaf blade- and leaf sheath-associated bacterial community and assessment of their responses to environmental changes of CO₂, temperature, and nitrogen levels under field conditions, *Microbes and Environments*, 査読有り, Vol. 30, 51-62 (2015)

DOI: 10.1264/j sme2.ME14117

Satoru Tomita, Tadashi Nemoto, Yosuke Matsuo, Toshihiko Shoji, Fukuyo Tanaka, Hiroyuki Nakagawa, Hiroshi Ono, Jun Kikuchi, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yasuyo Sekiyama*, A NMR-based, non-targeted multistep metabolic profiling revealed L-rhamnitol as a metabolite that characterised apples from different geographic origins, *Food Chemistry*, 査読有り, Vol. 174, 163-172 (2015)

DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.028

[学会発表](計 4 件)

関山恭代, 富田理, 根本直, 池田成志, 農業・食品研究のための NMR メタボロミクス, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

富田理, 池田成志, 津田省吾, 染谷信孝, 浅野賢治, 菊地淳, 関山恭代, NMR メタのリックプロファイリングを利用した農作物の特性解析, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

関山恭代, NMR メタボロミクスによる農作物・農産物の解析例とフードメタボロミクスの動向, 「メタボロミクスを活用した農産物評価技術」に関するワークショップ, 2015 年 1 月 14 日 R&B パーク札幌大通サテライト(北海道札幌市)

Satoru Tomita, Tadashi Nemoto, Yosuke Matsuo, Toshihiko Shoji, Fukuyo Tanaka, Hiroyuki Nakagawa, Hiroshi Ono, Jun Kikuchi, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Yasuyo Sekiyama, NMR-based metabolic profiling for the identification of potential metabolite markers to characterize apples from different origins, *Food Chemistry*, The 10th International Conference of the Metabolomics Society, 2014 年 6 月 25 日, 東京第一ホテル鶴岡(山形県鶴岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関山 恭代 (SEKIYAMA Yasuyo)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・主任研究員

研究者番号: 60342804

(2) 連携研究者

長谷川 利拓 (HASEGAWA Toshihiro)

独立行政法人農業環境技術研究所・大気環境研究領域 上席研究員

研究者番号: 10228455