

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07704

研究課題名(和文)ダイズ体内代謝の環境応答性を考慮した生育・窒素獲得機作の解明

研究課題名(英文)Elucidation of growth and nitrogen acquisition mechanism considering metabolic response of soybean to environmental conditions.

研究代表者

岡崎 圭毅 (Okazaki, Keiki)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：40414750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズのポット試験により、土壌容量、乾燥、過湿条件に対する生理的応答性を代謝産物の解析により行い、地上部や根部において一定の影響が認められた。乾燥ストレスに関しては、4回分の葉身試料の解析を実施し、乾燥ストレスに対して共通した応答を示す指標として、イノシトール類が有望であることを見出した。過湿ストレスについては、処理の2週間後も代謝産物プロファイルに影響が残ることを見出した。RNA-seqにより、この過湿ストレスの履歴が遺伝子発現に及ぼす影響を調査し、一定の影響が残ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ダイズの乾燥および過湿条件等の組み合わせによる影響メカニズムの理解が進展し、ストレスの指標となる複数の成分を特定することに成功した。これらの知見は、今後気候変動環境下における作物の頑強性向上に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Based on pot experiments, physiological response to soil capacity, dryness, and flooding conditions was carried out by analysis of metabolites. As a result, it was indicated that a certain influence was recognized in the shoot and the root by each stressor. Four experiments were analyzed and inositols was selected as indices with a consistent response to drought stress. Regarding flooding stress, it was found that changes occur in the ground part, such as the effect remaining on the metabolite profile even after 2 weeks of treatment. RNA-seq investigated the effects of the history of flooding stress on gene expression in subsequent dry stress conditions, and clarified that certain effects remain.

研究分野：植物栄養・土壌学

キーワード：ダイズ メタボロミクス GC/MS 土壌水分 乾燥 過湿

1. 研究開始当初の背景

(1)大豆の生産量やタンパク含量は年次変動が大きく、国内大豆生産の律速要因であることが知られている。特に近年は、干ばつや長雨などの異常気象が多発しており、ダイズ生産者はしばしば大きな被害を被っている。このような異常気象条件下における影響は生産者によって異なり、土壌物理性が悪く生産力の低い圃場では被害が大きい事例が多く認められる。生産の安定化を進めるためには、生産性や品質の変動メカニズムを明らかにして、気候変動に対してより頑強な栽培法を選定するための手法を提示することが重要である。

(2) 研究開始時点において、大豆根部を乾燥および過湿条件におくと、葉身及び根部において糖・有機酸・アミノ酸類の濃度が大きく変動すること。ダイズ根域が制限されると、窒素固定に由来すると考えられる特定の代謝産物が根・茎中に蓄積し、葉身部の糖類は逆に減少すること。また、このような条件下において、窒素集積関連では窒素固定に由来する代謝産物が、光合成関連では糖類が特に大きく変動しており、土壌環境の変化に対してダイズが鋭敏かつ特徴的な応答をしていることが明らかになっていた。

2. 研究の目的

(1)異なる乾湿パターンにおける代謝応答を明らかにするとともに、これらがダイズ生産性や窒素集積に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 乾湿パターンおよび根域制限を組み合わせた場合に生じる制限要因を明らかにし、圃場レベルで利用できる指標を明らかにする。

(3)ダイズにおける高い窒素集積特性を説明づけるため、根の乾燥過程前後での窒素動態を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ダイズ(ツルムスメ、サチユタカ)を播種し33日間ガラス室内で栽培した後にサンプリングした。処理は以下の通りとした。【根域制限処理】遮根シートを用いて根の領域を制限した土壌容量処理(広:5L, 中:3.5L, 狭:1.7L)を行った。【乾燥処理】C-C: 標準処理(最大容水量の70%), D-D: 乾燥処理(pF3.8), D-C: 7日間乾燥処理後、3日間標準処理【過湿処理】3処理(C-C: 標準(最大容水量の70%、21日), W-W: 過湿(ポット下部5cm程度を湛水、21日), W-C: 過湿(5日) 標準(16日))とした。異なる条件でダイズのポット栽培を行い、対照、乾燥および回復処理を表1の要領で実施した。水分量の目標は最大用水量の70%およびpF3.8とした。葉試料は上位葉(上からおおむね3節目の完全展開葉)とした。

(2) 経時的な変化を明らかにするため、つくばみらい市圃場においてダイズ2品種(サチユタカ、作系207号)を栽培し、上位葉及び下位葉(下から3節目の主茎に繋がる葉)を同じ区画から継時的に採取した。排水性の違いによる影響を検証するため、筑西市現地生産者圃場における4圃場からダイズの葉身を採取した。

(3) 上記の試料について、採取後に凍結乾燥した。粉碎試料をメタノール:クロロホルム:水

= 3 : 1 : 1 に浸漬し、可溶成分を抽出後、誘導体化を行った(図1) GC/MS に導入し、糖・有機酸・アミノ酸の測定を行った。

(4) ポットおよび圃場試験より収集したダイズ葉身試料 120 点について HPLC 分析によりピントール(イノシトールの一種)濃度を測定し、同じ試料を近赤外分光装置(NIRFlex N-200, Buch japan)により測定した。120 点の葉身試料について装置付属ソフトウェアに PLS 解析を実施した

(5) 過湿条件に置かれた履歴の有無と乾燥ストレスの組み合わせによる生理的影響について RNA-seq により解析を行った。標準処理条件を加えた 3 条件の比較を実施し、対比較解析で算出される $q\text{-value} \leq 0.05$ かつ一定以上の変化があった遺伝子(DEG)を選抜し、エンリッチメント解析を行った。

4. 研究成果

(1) 遮根シートを利用して根域を制御したポット試験により、ダイズの土壤容量(根域の深さ)が葉身および茎部の代謝物組成に及ぼす影響を調査した。糖・有機酸・アミノ酸などの 66 代謝物濃度を主成分分析したところ、葉身では第 1、第 2 主成分スコアにより土壤用量処理に由来する組成の違いが特徴付けられた(図 1)。土壤容量減少に伴う代謝産物の変化のうち、部位によらず一貫していたのは、プロリン(Pro)、N-アセチルグルタミン酸(NA-Glu)、アラントイン(Allan)、アスパラギン酸(Asp)、ピントール(Pin)の増加であった。一方、myo-イノシトールは全ての部位で減少していた。その他、リンゴ酸(Mal)、フマル酸(Fum)は葉身で増加、クエン酸(Cit)は茎および根部で増加していた。葉身の糖含量はスクロース(Suc)が減少、グルコース(Glc)とフルクトース(Fru)は判然としなかった。一方、ポット試験における通気性と乾燥処理の窒素代謝に対する複合効果については明瞭な傾向が認められなかった。

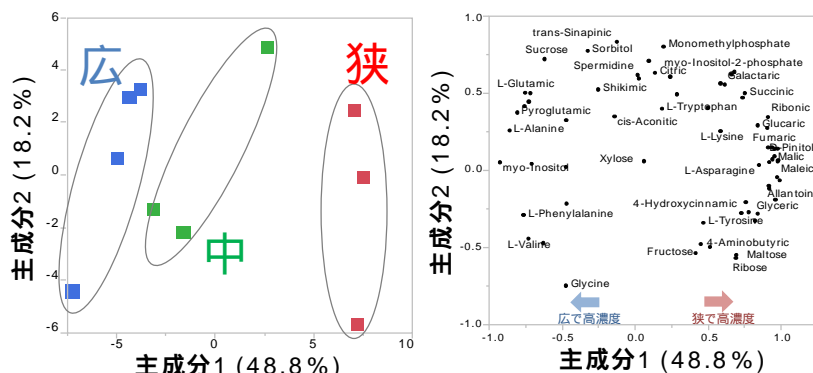


図 1 ダイズ葉身における代謝物組成の主成分スコア(左)およびローディング(右)根域制限処理との関係。狭・中・広は根域の大きさに対応する。

(2) 乾燥環境を想定したダイズのポット栽培を行い、対照、乾燥および回復処理を実施した。2012年、2013年、2017年（2時期）の4回分の葉代謝物データを統合した。機械学習で乾燥処理の強さを判別できるモデルを構築したところ、Test 正答率 96%を示す良好な判別モデルを取得した。モデルへの寄与（変数重要度）の高い成分を詳細に解析したところ、イノシトール類などは、異なるロットにおいても同様の傾向を示していた（図2）。一方、窒素代謝との関連が期待されたアミノ酸類は、ロット間で傾向が異なっており、乾燥ストレスとの関係は判然としなかった。

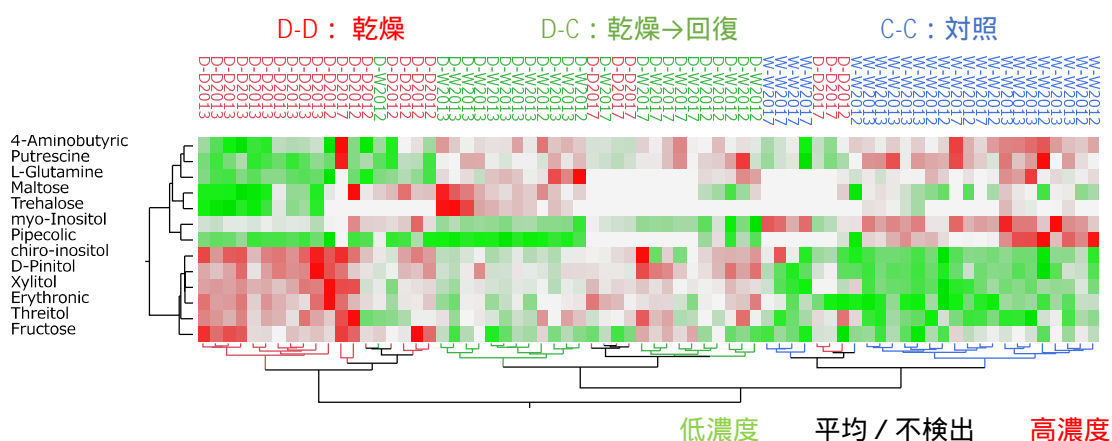


図2．変数重要度の高い13成分による階層型クラスター解析

(3) 圃場試験で栽培したダイズを用い経時変化を観測した。品種の違いや生育ステージ等の様々な条件で変動することが確認され、水分ストレスを調査する場合には条件を揃える必要があることが示唆された。また、茨城県生産地の排水性の異なる圃場において、排水性の高い圃場において、(2)で水分ストレス指標とした物質の増加が確認された。

(4) 近赤外分光により(2)で見出された乾燥ストレスの指標成分について、非破壊計測の適用可能性を検討した。その結果、有意なモデルを得ることができたものの、RPD 値等の評価が低かったため、実用的に用いるためにはさらなる改良が必要と判断した（図3）。一方、揮発性成分については乾燥ストレスにより特異的に増加する物質を特定し、特許出願を行った。

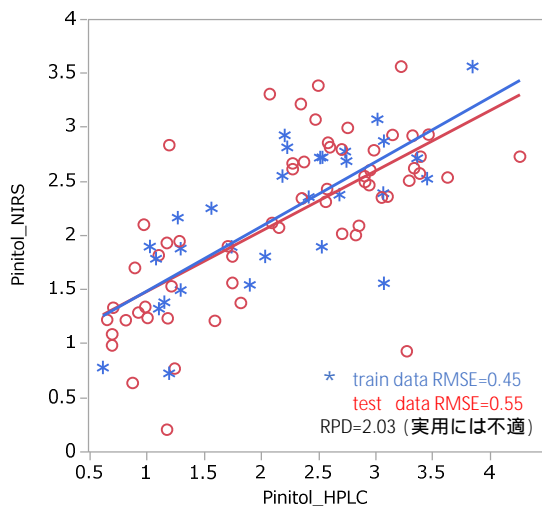


図3 乾燥ストレス指標のNIRSによる予測値と実測値の関係

(5) 湿害の影響については、ポット試験により過湿処理の2週間後も代謝産物プロファイルに影響が残ること、湿害に加えて乾燥条件にした際に葉身の斑点が増加するなど、地上部に変化が生じることを見出した。さらに、過湿処理の履歴がある植物体において糖類の減少など代謝産物の蓄積量に影響が残ることを明らかにした。

(6) 過湿条件に置かれた履歴の有無と乾燥ストレスの組み合わせによる生理的影響についてRNA-seqにより解析を行った。標準処理条件を加えた3条件の比較を実施し、発現量(FPKM値)の主成分分析において処理の違いが反映されることを確認した(図4)。その結果、乾燥条件の2処理では標準処理と比較して広範囲の非生物ストレス応答、プロリン合成、イオン恒常性維持などに関わる遺伝子の発現量が上昇しており、広範囲の非生物ストレス遺伝子の誘導が確認された。過湿履歴の有無による違いについては、乾燥ストレスと比較するとかなり軽微であったが、湛水履歴有りでエチレン応答性遺伝子や酸素化合物応答遺伝子の発現量が増加し、逆にイオン輸送や非生物的ストレス応答に関わる遺伝子群の減少が示されており、同じ乾燥条件下でも過湿履歴の有無によって生理的な応答が異なることを示唆していた(表)。

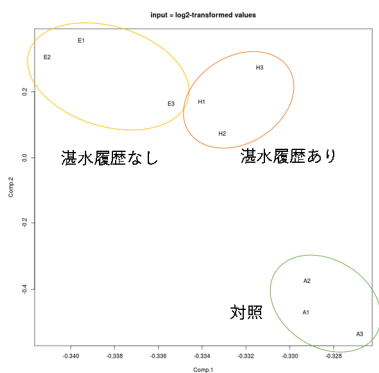


表 . RNA-seq データのGO エンリッチメント解析

湛水履歴あり/履歴なし (乾燥処理)	GO name	Fold_enrichment	P value
up regulated genes	cellular response to hypoxia	4.69	5.85E-06
	response to water deprivation	4.67	5.93E-10
	response to chitin	4.63	1.55E-02
	response to heat	3.66	1.63E-02
	response to abscisic acid	3.52	3.30E-07
	response to cold	3.22	3.12E-04
	response to salt stress	3.2	1.35E-04
	response to oxidative stress	2.73	1.72E-02
down regulated genes	carboxylic acid transport	8.67	1.91E-02
	ion transmembrane transport	5.56	4.72E-04
	ion homeostasis	5.13	1.85E-02
	protein phosphorylation	2.86	1.52E-02
	response to abiotic stimulus	2.38	6.73E-04

図4 .RNA-seq データの主成分分析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiki Okazaki, Fukuyo Tanaka, Yoshinari Owaki
2. 発表標題 Evaluating Soybean Drought Status with Leaf Metabolite Indices.
3. 学会等名 ASA, CSSA and SSSA International Annual Meetings (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡崎 圭毅、山田 哲也、田中 福代、大脇 良成
2. 発表標題 代謝物分析によるダイズにおける土壌水分の低下を反映する指標探索
3. 学会等名 日本作物学会第246回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡崎 圭毅、田中福代、中村 卓司、岡 紀邦、大脇良成
2. 発表標題 作物体分析によるダイズの根圏環境の推定 - 土壌水分条件と地上部代謝産物の関係 -
3. 学会等名 根研究学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 植物の乾燥ストレス診断方法	発明者 岡崎圭毅、田中福代	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-219278	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
連携研究者	高橋 智紀 (Takahashi Tomoki) (00355562)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター 水田作研究領域・グループ長 (82111)	
連携研究者	大脇 良成 (Ohwaki Yoshinari) (60355542)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター 土壌肥料研究領域・領域長 (82111)	

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