

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月21日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15240

研究課題名(和文)窒素栄養-維管束形成の間を説明する機械学習モデルの高精度化と分子生物学的証明

研究課題名(英文) Development of machine-learning model of relation between nitrogen nutrition and development of vascular bundles and validation using molecular biology.

研究代表者

梶 雄介 (Kakei, Yusuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・主任研究員

研究者番号：50636727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は環境からトマト苗姿が決定される際に関わることが想定される分子機構がどの程度実際の苗姿と関わっているかを定量化し、高精度なシミュレーションモデルを立てることにあった。研究の結果、複数の転写因子bZIPがいくつかのXTHの発現調節を介して維管束の発達を制御していることが明らかとなった。トマトの苗姿に大きな影響を与える窒素栄養が維管束の発達、遺伝子発現にいつ、どの部位でどの程度影響を与えるのかを定量化し、温度条件との関係性も明らかにすることができた。この結果を用いて栄養条件および温度条件の入力からトマト苗の草丈と茎径をシミュレーションできるソフトウェアを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

苗の成長は品種や育苗装置などの環境によって大きく変わる。新たな苗の最適な栽培法の確立には、作物の栽培生理に詳しい人物が試行錯誤により得られた経験をもとに最適な育苗環境を調節する必要があった。これまでに、分子生物学的手法を用い、植物体内の遺伝子発現や代謝産物等の動態を解析すること、いわゆるオミクス研究を行い、多くの知見を蓄積した。本研究では植物体内の分子変動とその後の苗姿を機械学習し、品種・品目の特性に応じた栽培シミュレーションを行うツールを開発した。このツールを用いることにより、熟練管理者ではなくても栽培法の確立ができるようになる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is the quantification of relationship between the molecular mechanism which is involved in determination of the seedling shape in response to environments and the actual shape of the seedlings in order to build a highly accurate simulation model. My results showed that several bZIP transcription factors regulate development of vascular bundle through transcriptional expression of several XTH genes. Next, I quantified spatiotemporal effect of nitrogen nutrient to gene expressions and built a model of relation between gene expression and vascular bundle development. In addition, the effect of temperature to these relationships was also quantified. Using these results, I developed software that is able to simulate the height and stem diameter of tomato seedlings from the nutrient condition and temperature as inputs.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：トマト 育苗 窒素栄養 維管束

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 1-1) ビッグデータと機械学習から得られたトマト収量と維管束の発達の関係性

申請者は植物工場で栽培されたトマトのトランスクリプトーム、環境データ(水分・栄養条件、日照・気温・湿度・CO<sub>2</sub>濃度など)、植物生育データ(茎径、葉面積、高さ、着花数、トマト収量、時間あたり乾物生産量など)、品種、ホルモン含有量、果実成分分析結果(アミノ酸類・有機酸類・糖類など)、障害果発生率の大規模なデータ収集に参画してきた。機械学習手法とデータベースの開発によりトランスクリプトームと他のビッグデータ中のパラメーターとの関係をモデル化してきた。トマトの成長速度は光強度、CO<sub>2</sub>濃度、窒素栄養などにより大きく影響されるが、成長速度を遺伝子発現で説明するモデル中では、光合成関連タンパク質の遺伝子やアミノ酸代謝酵素遺伝子、サイトカニン応答性の遺伝子などが成長速度に特に関連することがモデル中の変数選択から示唆された。この解析では統計的に多くの遺伝子が同じ生理機構に関わり、同時に通常の交互検定をしても関連があるという二重の検証がなされモデルの精度を高めている。また、これらの変数同士の関係性はこれまでシロイヌナズナ(Takataniら2014)、イネ(牧野ら2011)、ダイズ、エンドウ、ホウレンソウ(熊谷ら2015)などにおいてCO<sub>2</sub>施用濃度や窒素肥料供給量が植物の成長と遺伝子発現に与える影響の研究結果と一致している。

申請者はこのように構築してきたモデルの中で特に、窒素肥料供給量及び維管束の発達に関わる遺伝子発現とトマト収量の間に関係があることに注目していた。この関係性はトマトの収量を増加させる栽培管理の開発に応用できる可能性がある。トマトの微細構造の観察からも維管束の発達と収量の間に関係が明らかになっていった(岩田ら2017)。一般的なオランダ品種は茎の維管束面積が大きく、導管液の出液速度も早い。日本型の品種はそれと比較すると維管束面積が小さい。特定の台木品種に接ぎ木をすると日本品種は維管束面積が大きくなる。この維管束面積の違いとトマト果実の収穫量が日本型トマト(接ぎ木なし)、日本型トマト(接ぎ木あり)、オランダ型トマトの順で多くなることが一致していた。維管束面積はサイトカニン(iP)の量とも相関していることが分かっている(Review by Campbell and Turner 2016)。

#### 1-2) オーキシシン・サイトカニン・ブラシノステロイド(BR)と維管束の発達

オーキシシンとサイトカニンは維管束形成に不可欠であることが以前から知られている(福田ら1997)。またサイトカニンは、CO<sub>2</sub>固定や窒素栄養など、植物の成長に重要な栄養の状態に応じて地上部・地下部の発達のバランス調整を担っていることが明らかになりつつある(木羽と榊原2016)。一方、窒素栄養に応じてオーキシシン関連遺伝子の発現が変動し、維管束が大きく成長することがポプラで報告されている(Euringら2014)。BRは維管束の分化を制御する植物ホルモンとしてよく知られており、さらにBRを処理したイネは収量が増加することが報告されている。維管束形成を制御する因子の分子メカニズムについてはシロイヌナズナを用いた研究により、マスター転写因子VND6、VND7などの働きとその下流で働く遺伝子が知られている(山口ら2010)。

#### 1-3) オーキシシン・BR・窒素栄養に共通して発現制御を受けるbZIP転写因子

申請者はオーキシシン生合成阻害剤を複数開発してきた。それらを用いたトランスクリプトーム解析を行い、複数のオーキシシン阻害剤に共通して発現が応答し、オーキシシンの投与により発現応答が解除される遺伝子としてbZIP型転写因子を2つピックアップした。これらはVND6、VND7と共発現することから維管束に関わる転写因子であると考えている。またこのbZIP転写因子の遺伝子発現を遺伝子発現データベースAtCAST3.0(筑と嶋田2015)を用いて解析したところBRと窒素欠乏・過剰処理の複数の実験においても有意に変動していることが分かった。

#### 1-4) 研究背景まとめ

「植物工場プロジェクト」のトマトビッグデータから構築したモデルではトマトの栽培環境条件、維管束面積と収量の間を遺伝子発現などの分子生物学的な証拠から説明できる道筋がつけられたと考えている。しかし、ここで発見したモデルを栽培技術へ応用していくためにも、分子生物学研究によるメカニズムの解明が不可欠である。維管束面積が決定されるメカニズムをより深く理解するためには遺伝子発現との関係がわかるだけでは不十分である。一方、自身が進めている他の研究結果から示唆されているホルモン及び転写因子が窒素栄養による維管束の発達制御のメカニズムに関わっている仮説を調べることによって、栽培環境が植物ホルモンと転写制御因子を介して、維管束の発達を制御するメカニズムの解明に繋がることを着想した。

## 2. 研究の目的

「植物工場プロジェクト」のトマトビッグデータでは栄養条件はEC(電気伝導度で示す養液濃度)により管理されていたため、窒素と他の栄養素の濃度は連動して変動していた。本課題ではまずトマトにおいて窒素栄養が単独で維管束の発達、遺伝子発現に影響を与えるのかを検証する。この実験で得られたデータはビッグデータの機械学習によるモデルの改良に用いる。また、申請者が見出したオーキシシン、BR、窒素栄養に共通して制御されるbZIP型転写因子が維管束形成にどのような影響をあたえるのかを解明することにより、窒素栄養とオーキシシン・ブラシノステロイドに制御され維管束形成に関わるシグナル伝達を解明することを目指す。サイトカニンは維管束の形成に関わるが、維管束の篩部において合成されることが知られているため、研究対象のメカニズムにおいて、サイトカニンが維管束形成を制御する(原因)か、維管束形成によって量が制御される(結果)かどうか不明であった。本課題の研究を通じてサイトカニン

と、窒素栄養による維管束発達の制御メカニズムの関係についても明らかになると考えている。

### 3. 研究の方法

これまでにトマトのロックウール培土を用いた施設栽培では用いる養液の濃度( EC )と維管束の成長、サイトカイニン量との間に関連があることが導かれている。本研究ではまず養液中の窒素以外の濃度をほぼ固定し、窒素( 硝酸 )濃度のみが変動する実験系においてこれらとの間に関連性が見られるかどうかをトマトを用いて検証した。得られたデータから窒素栄養変動時のサイトカイニン応答性・維管束発現遺伝子の発現変動や維管束の発達速度の変化をモデル化することによりトマト収量モデルの拡張・高精度化を行う。さらに窒素栄養とオーキシンの下流で維管束の発達を制御していると予測された bZIP 転写因子の機能をシロイヌナズナを用いて解析した。窒素栄養による植物の維管束発達の制御機構を調べる。

具体的には大きく以下の3項目に分けて研究を遂行する。

#### 1) 窒素栄養と維管束発達の関係の解析、および植物ホルモン関連遺伝子・維管束関連転写因子発現量解析

前述の通りポプラでは窒素栄養が維管束の肥大を促す( Euring ら 2014 )。窒素栄養がトマト維管束発達速度と関連遺伝子の発現に与える影響を調べるため、硝酸濃度を 0.1 mM から 14 mM まで段階的に調整した水耕液を用いてトマト( 桃太郎ヨーク )を維管束の発達に有意な差がみられた4週間まで生育させ毎日の草丈と茎径を測定した。硝酸カリウムと硝酸カルシウム( 3 : 2 )の濃度上昇に伴って硫酸カリウムと硫酸カルシウムの濃度を減少させ、それらの合計イオン濃度が 20 mM になるように調節した。その他のイオンの溶液濃度は大塚 A 処方の水耕液濃度に合わせた。前実験において高イオン強度は発芽を阻害したので播種後3日は蒸留水を与えた。子葉の直下の茎系を測定することにより非破壊的に維管束の成長得度を記録することにした。いくつか同じ部位のトマト茎の横断切片を作成してその比を顕微鏡観察し、比例関係にあることを書き人した。また同時に関連する遺伝子の茎における発現を qRT-PCR により解析する。サイトカイニン応答性遺伝子である *ARR7*、*ARR19* ホモログ( *Solyc06g048930* と *Solyc05g0142260* )、オーキシン応答性遺伝子 *Aux/IAA1* のホモログ、BR とオーキシンに共通して制御される *Aux/IAA19*、*Aux/IAA5*、窒素栄養・オーキシン・BR に制御され維管束に発現する *At1g59530* ( *AtbZIP4* )、*At1g68880* ( *bZIP* ) のホモログなどを測定した。

#### 2) モデルの拡張・高精度化と機械学習の深化

1) のデータを用いて、窒素栄養・維管束形成・遺伝子発現の関係を再度モデル化する。新たなデータを用いることでこれまでに収集したデータの硝酸濃度範囲( 0.8-3.2 mM )より外側のデータまで図1のモデルの適用範囲を広げることができる。さらに、これまで様々な栄養素の供給量が EC として1つの変数として扱われていたが、窒素とそれ以外の栄養素の与える影響を分離できることから、本研究データの追加によりモデルが高精度化されると期待している。一方で、既存のビッグデータを用いたモデル構築に新しい機械学習手法を取り入れる。一般的に多次元の変数からの重回帰は次元数が多くなると、必要とされるデータポイント数が指数関数的に増え、機械学習にとっても最適解を得ることが難しくなってくる( 次元の呪い )。今のところ相関する変数同士( 気温と日射量など )をまとめることで次元数を圧縮し最適解が求められているが、今後それぞれの栄養素の別々の影響を考える上では次元数の増加に対応しなくてはならない。解決法の案として、学習の中で次元の圧縮を同時に行う randomforest ( RF ) 回帰法の利用などが考えられる。これまでに RF 回帰法でモデルを学習させる試みを行っているおり、次元数が少なくはっきりとした相関があるデータからは上記のモデルと同じような関係性が抽出できることが分かっている。しかし、ノイズを多く含むデータで次元が増えると結果が変わってしまうことも明らかとなった。どのようなデータの前処理と機械学習手法の組み合わせで栽培環境と植物成長の関係をうまく説明できるモデルが得られるのか試行錯誤した。

#### 3) 窒素栄養・オーキシン・ブラシノステロイドに制御される bZIP 転写因子の解析

窒素栄養・植物ホルモンに制御される bZIP 遺伝子2つについては遺伝子近傍へのシロイヌナズナ T-DNA 挿入変異体が報告されておらず、変異体はデータベースにも登録されていない。そのことからこれらの遺伝子のノックアウトは致死性である可能性を考え、RNAi 法により遺伝子機能をノックダウンした植物体を作成した。これらの bZIP 転写因子遺伝子2つの転写領域( *At1g59530.1*、*At1g68880.1* )から RNAi 用に5'末の逆鎖フラグメント配列を選択して CaMV35S プロモーターの下流に組み込んだベクターを構築し、ベクターを用いて形質転換したシロイヌ

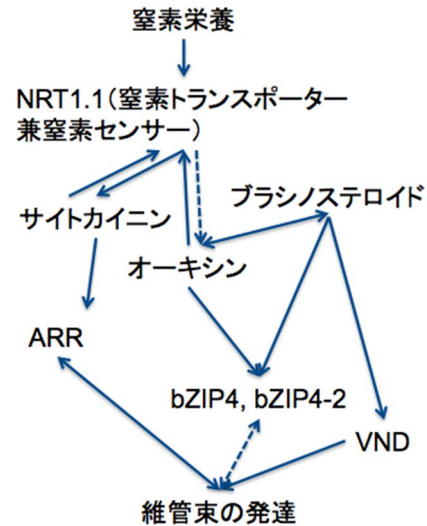


図1 窒素栄養による維管束発達制御のメカニズム(作業仮説)

実線は既知の制御、点線は予想される制御を示す。

ナズナから種子を収穫した。得られた種子から発現が抑えられた組み換え植物を選抜し、維管束の発達とその窒素栄養・ホルモン応答性を測定した。具体的には根端から維管束が発達開始する位置、及び成熟する位置までの距離が長くなるかどうかや維管束面積が窒素栄養の変化、サイトカイニン、オーキシン、オーキシン生合成阻害剤、ブラシノステロイド、ブラシノステロイド生合成阻害剤処理の影響を受けるかを調べた。

シロイヌナズナのトランスクリプトームデータベース eFP ブラウザによると、これらの bZIP 転写因子は根と茎の分化中維管束などにより強く発現することが示されている。発現が低い bZIP の場合はこのデータの信頼性は低かった。そこで、組織局在、細胞内局在確認のためにネイティブプロモーター-GFP 組み換え植物を作成した。3) については共発現解析、遺伝子近傍上流配列の G-box 配列の保存性などから bZIP 転写因子の制御下にある遺伝子として *AtXTH12*, *AtXTH13* を予測している。これらの遺伝子について bZIP の発現抑制変異体において遺伝子発現の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

本課題ではまず、トマトの苗姿に大きな影響を与える窒素栄養が単独で維管束の発達、遺伝子発現にいつ、どの部位でどの程度影響を与えるのかを定量化した。例えばトマト品種 CF 桃太郎ヨークを水耕栽培で総イオン濃度を保ったまま硝酸イオン濃度を 2.8 mM と 14 mM で生育した場合、維管束面積と子葉直下の茎径に差が出始めるのは 17 日目からであったが、維管束の発達を促すサイトカイニンの合成酵素 *SIIPT3* の遺伝子発現は 14 日目までに硝酸イオン濃度が高い試験区で同じ部位で高くなっていった(図 2)。これまでのシロイヌナズナなどを用いた報告でサイトカイニン量と維管束面積は平行な関係が報告されていたが、サイトカイニン量は維管束面積の増大に先立って窒素栄養の影響により増加し、サイトカイニン量が維管束面積を制御していることが明らかになった。

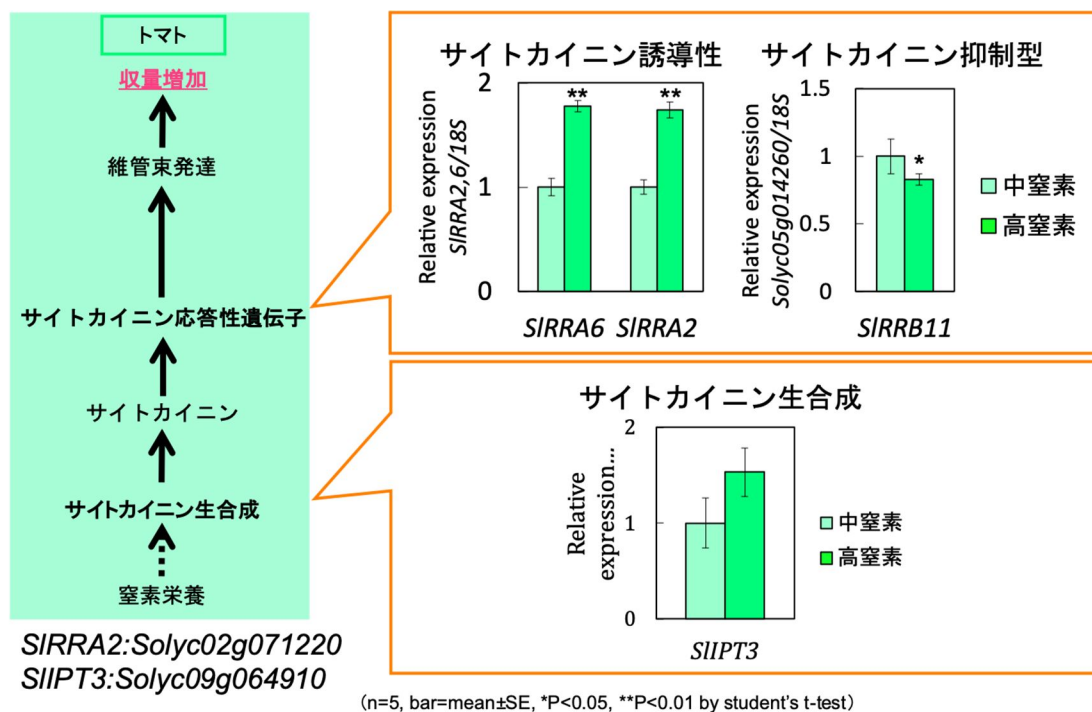
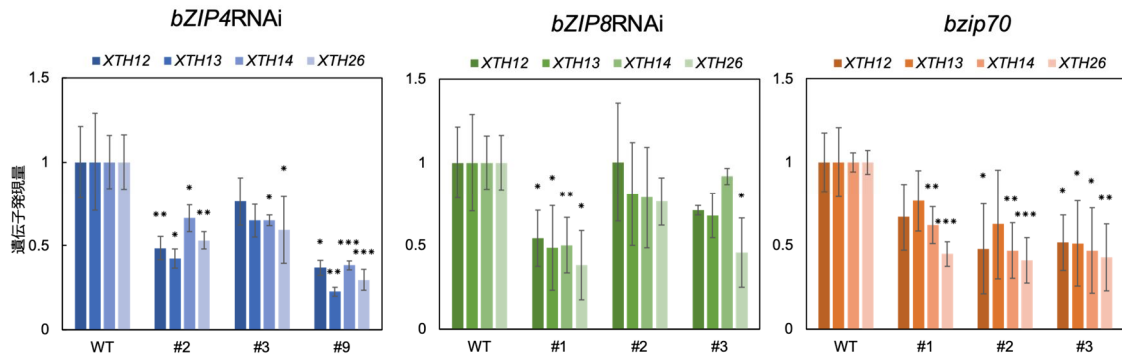


図2 トマトサイトカイニン合成・応答性遺伝子の窒素栄養応答

中窒素(2.8 mM)と高窒素栄養条件(14 mM)で育てたトマト苗について、維管束面積に有意差が出る17日目の前、14日目時点におけるサイトカイニン生合成遺伝子 *SIIPT3*、応答性遺伝子 *SLRRA2*, *SLRRA6*, *SIRRB11* の遺伝子発現量を RT-PCR により定量し、*S18* 発現量で標準化した。

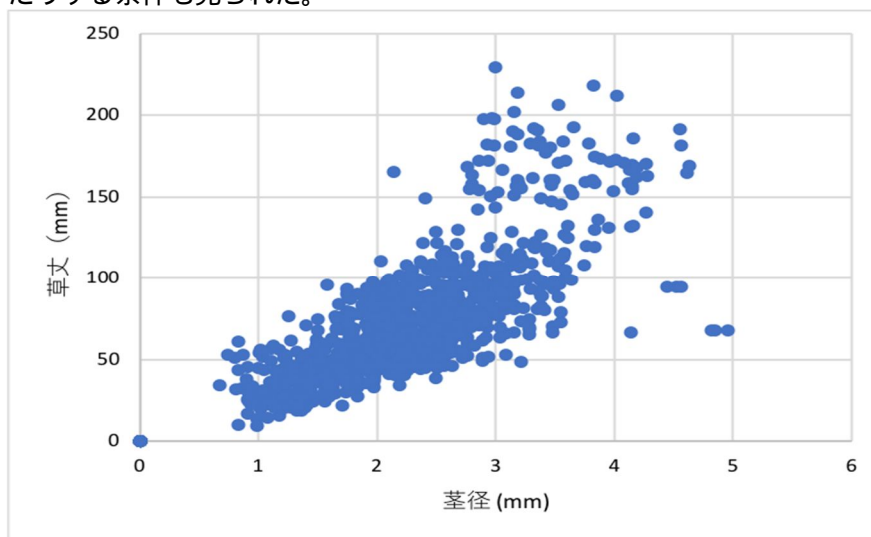
オーキシンの濃度低下時に発現量が低下する 2 つの bZIP 転写因子遺伝子はその RNAi 遺伝子発現抑制変異体(bZIP70 は T DNA 挿入機能欠損変異体)において、維管束に多いキシログルカンを再編成する XTH 遺伝子のうちいくつかの発現が低下したことから窒素栄養（オーキシン、ブラシノステロイド）*bZIP* *XTH*(維管束成長)のシグナルカスケードの存在が示唆された。



**図3 シロイヌナズナ bZIP 発現抑制植物における XTH 遺伝子の発現**

bZIP4, bZIP8, bZIP70 それぞれの機能抑制植物について *XTH13*, *XTH14*, *XTH26* の遺伝子発現量を RT-PCR により定量し、ユビキチン発現量で標準化した後、野生型(WT)発現量に対する相対値で示した。横軸は遺伝子組み換え系統番号を示す。n=3, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 bar means  $\pm$  SE

これらの実験で得られた制御関係の定量データはビッグデータの機械学習による育苗モデルの改良に用いた。変数が増えて関係性が複雑になっていた部分はニューラルネットワークモデルを用いることで誤差が少ないモデルをたてた。最終的なモデル内ではサイトカイニン関連遺伝子、ジベレリン関連遺伝子とアブシジン酸関連遺伝子の環境に応じた応答と、下流の遺伝子の働きの強さからトマト苗の草丈と茎径をおおよそシミュレーション可能であることがわかった。このモデルではデータ収集済みのいくつかの品種、72 穴育苗セルトレイという条件下において育苗 21 日目の苗姿を茎径が 1.8 から 7 mm, 草丈が 15 から 21 cm の間で制御シミュレーションできる。おおよそ草丈と茎径は比例関係にあるが、より草丈が大きかったり茎径がより太かったりする条件も見られた。



**図3 CF 桃太郎ヨークの播種後 17 日目の草丈と茎径シミュレーション結果**

昼間温度 22 度から 30 度、夜間温度 17 度から 30 度、養液 EC0.8 から 3.4、nDIF (昼夜温度逆転) 日数 0 から 7 日のデータ範囲で 1 万点シミュレーションした。

<引用文献>

- 1 Takatani N, Ito T, Kiba T, Mori M, Miyamoto T, Maeda S-I, et al. Effects of high CO<sub>2</sub> on growth and metabolism of Arabidopsis seedlings during growth with a constantly limited supply of nitrogen. *Plant Cell Physiol.* 2014 Feb;55(2):281–92.
- 2 Makino A. Photosynthesis, Grain Yield, and Nitrogen Utilization in Rice and Wheat. *Plant*

Physiology. 2011;155(1):125–9.

3 Kumagai E, Aoki N, Masuya Y, Shimono H. Phenotypic Plasticity Conditions the Response of Soybean Seed Yield to Elevated Atmospheric CO<sub>2</sub> Concentration. *Plant Physiology*. 2015;169(3):2021–9.

4 岩田悠希, 中川梓, 矢野加奈子, 今西俊介, 高橋宏和, 中園幹生. トマトにおける養液濃度の二次木部組織発達への影響 育種学研究. 2017;19:100.

5 Campbell L, Turner S. Regulation of vascular cell division. *J Exp Bot*. 2017 Jan 1;68(1):27–43.

6 Fukuda H. Tracheary Element Differentiation. *The Plant Cell*. 1997 Jul 1;9(7):1147–56.

7 木羽隆敏, 榊原均. サイトカイニンの生合成と輸送. *植物の生長調節*. 2016;51(1):24–9.

8 Euring D, Bai H, Janz D, Polle A. Nitrogen-driven stem elongation in poplar is linked with wood modification and gene clusters for stress, photosynthesis and cell wall formation. *BMC Plant Biology*. 2014;14:391.

9 Yamaguchi M, Goué N, Igarashi H, Ohtani M, Nakano Y, Mortimer JC, et al. VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6 and VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7 Effectively Induce Transdifferentiation into Xylem Vessel Elements under Control of an Induction System. *Plant Physiology*. 2010;153(3):906–14.

10 Kakei Y, Shimada Y. AtCAST3.0 Update: A Web-Based Tool for Analysis of Transcriptome Data by Searching Similarities in Gene Expression Profiles. *Plant Cell Physiol*. 2015 Jan 1;56(1):e7.

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計3件)

1 笥雄介、嶋田幸久、バイオインフォマティクスへの機械学習の取り込みとオーキシン阻害剤開発、日本農薬学会第43回大会(招待講演)、2018

2 笥雄介、嶋田幸久、AI技術を利用したオミクスデータの高度統合による効率的な鍵因子特定法、園芸学会平成30年度秋季大会(招待講演)、2018

3 笥雄介、矢野加奈子、上野広樹、山田瑞樹、佐野大樹、前島慎一郎、前田健、樋江井清隆、太田雄也、西村浩志、磯崎真英、斎藤岳士、河崎靖、東出忠桐、鈴木克己、丹羽智子、石黒澄衛、鈴木孝征、高橋宏和、中園幹生、榊原均、澤田有司、松崎潤、平井優美、嶋田幸久、今西俊介、機械学習による高品質多収化栽培技術の開発に向けた環境・トマト生育・オミクス統合データの蓄積と標準化、第59回日本植物生理学会年会、2018

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。