

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450089

研究課題名(和文)イオノミクス・メタボロミクス解析によるRILsを用いた大豆青立ち耐性機構の解明

研究課題名(英文)The study of the mechanism of green stem disorder insensitivity of soybean RILs using metabolomics and ionomics techniques

研究代表者

中村 卓司(Nakamura, Takuji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター水田作研究領域・グループ長

研究者番号：60399425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：大豆では品質低下・減収を招く「青立ち」現象(莢先熟)が多発している。遺伝的特性と青立ち抵抗性の生理生化学的機構の関係を明らかにするため、青立ち抵抗性の異なるRILs(組換え自殖系統群)を用い摘英処理によって青立ちを発生させ、イオノミクスおよびメタボロミクスの手法を用いて青立ち程度と養分吸収や代謝経路を解析した。その結果、青立ち発生しやすい大豆RILは茎の有機酸・アミノ酸代謝が高まり、窒素含有率が上昇した。これは青立ちによって子実より茎へ養分が転流し、茎で窒素代謝が高まるためと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Green stem disorder (GSD) causes a serious problem in the soybean harvesting because seed coat surfaces are soiled and its quality is deteriorated during machine harvesting. The metabolite- and element-compositions in the stems of soybean RILs with different GSD sensitivity were examined using the metabolomics and ionomics technique to evaluate the relationship between the genetical traits and physiological mechanism of GSD insensitivity. In the sensitive RIL to GSD, the amino acid and organic acid metabolism were activated, results in the increase of nitrogen content of stems. It was suggested GSD was activated the nitrogen metabolism because the increase of the amount of translocation of the element to the stems, not to seeds.

研究分野：土壌肥料

キーワード：メタボロミクス イオノミクス 大豆 莢先熟 青立ち

1. 研究開始当初の背景

(1) 大豆では収穫期に莢が成熟して収穫に適する褐色になっても、茎葉が青々したまま枯死しない現象が多発する。このような現象は「青立ち」または「莢先熟」といわれる(写真1)。コンバイン等を用いて機械収穫を行う際に茎の汁が豆に付着すると汚損粒となり、品質低下の原因となる。また、コンバイン収穫のために、収穫前の青立ち株除去、脱粒作業の別日処理など労働時間の増加をもたらしている。H16年では低級粒の原因の12%が青立ちによる汚損粒となっており、解決が急がれる問題である(農林水産省, 2006)。



(2) 大豆の青立ちの発生原因は、開花期から結莢期にかけて虫害・高温・土壌水分などの各種ストレスによって着莢数の減少が発生し、ソース・シンクバランスが崩れることによる。このため、相対的にソース過剰となり炭素や窒素などの養分動態が乱され、茎などの栄養器官の老化が遅延して青立ちが発生すると考えられている(古屋ら, 1988)。青立ちの発生のしやすさは品種間差が存在しているが、羽鹿(2005)や山田ら(2011)は大豆育成系統である「東北129号」が強い青立ち耐性を示すことを明らかにし、この品種を用いて青立ちが多発する大豆品種「タチナガハ」との組み合わせから RILs(組換え自殖系統群)を作成した(羽鹿, 2005; 山田ら, 2011)。これらの RILs を用いて QTL 解析を行い、青立ちに関わる数個の QTL を見出してきている。

(3) 青立ち耐性の異なる上記の品種・系統は青立ち現象が顕在化するまえに、すでに養分動態が異なり、それに伴って代謝変動も起きているものと考えられ、この変動の差異をイオノミクスやメタボロミクスの分析手法を用いて解析することができれば、生育の早い時期に青立ちの前兆を捉え、その耐性に関わる生理機構を明らかにすることができる。また、青立ちの発生原因に関わる量的形質である代謝成分含有量は、複数の QTL に存在する原因遺伝子の変異と密接な関係があることから、QTL とイオノミクス・メタボロミクス解析を組み合わせることで、RILs の大豆を用いて青立ちに関わる養分元素・代謝産物を探索することにより、青立ち耐性系統の選抜指標となるばかりでなく、青立ち耐性に関わる遺伝的特性と生理的機構の関係を解明することができると思われる。

2. 研究の目的

青立ち耐性に関わる養分元素・代謝産物を探索し、各 QTL との関係性を明らかにするため、以下の項目について RILs を用いて解析を行う。

(1) RILs 栽培時の青立ち程度と栽培特性の関係

青立ち耐性 RIL(タチナガハ/東北129号)を用い、青立ち症状の程度と栽培特性の調査を行う。また、大豆青立ちの発生主要原因として結莢期までのシンク能低下によるソース能の相対的過剰が想定されることから、各 QTL とソース・シンクバランスとの関係を明らかにするため、RILs 各系統の結莢期に莢切除を行い、人為的にシンクサイズを減少させた処理区および対照区の青立ち発生程度について調査を行う。

(2) 結莢期の茎葉の元素・代謝産物の網羅的解析による青立ち耐性に関わる養分元素・代謝産物の探索

RILs の栽培を行い、結莢期の茎葉の養分元素および代謝産物について ICP-MS や GC-MS 等でイオノミクスやメタボロミクスの手法を用い網羅的に分析を行う。また、多変量解析を用いデータマイニングを行い、青立ち耐性と関係性の高い養分元素・代謝産物を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RILs 栽培時の青立ち程度と栽培特性の調査および莢切除による影響の評価

① 供試材料

2013年に「東北129号/タチナガハ」の交雑に由来する RILs (F10) から、青立ちに寄与する QTL である、qGSD1、qGSD2、qGSD3 (E3) の3座で8グループに分類し、それぞれ3系統ずつ供試した(表1)。2014年には同じ系統群を供試。2013年には、最初の莢が最大長に達した時期(R5)に50%、100%を摘莢する処理および無処理で試験を実施した。2014年には50%の処理と無処理のみ実施した。

表1. 材料とQTL 遺伝子型

系統名	遺伝子型グループ	qGSD1	qGSD2	qGSD3 (E3)
SIT51, SIT73, SIT85	1	A	A	A
SIT5, SIT10, SIT33	2	A	A	B
SIT28, SIT32, SIT40	3	A	B	A
SIT37, SIT39, SIT78	4	B	A	A
SIT57, SIT75, SIT94	5	A	B	B
SIT12, SIT14, SIT42	6	B	A	B
SIT30, SIT49, SIT69	7	B	B	A
SIT16, SIT7, SIT8	8	B	B	B

A:東北129号、B:タチナガハ
E3は早晩性の遺伝子座、東北129号が晩生型。
QTLの効果は、qGSD1 > qGSD2 > qGSD3の順。
供試系統の花色はいずれも紫。
QTLの近傍マーカーは、qGSD1: GMES1506、qGSD2: Satt114、qGSD3: Satt229を用いた。

② 栽培方法

作物研究所の試験圃場で栽培試験を実施。施肥は、化成肥料、苦土石灰、熔リンを全量元肥で施用。播種日は、2013年7月5日、2014年6月26日。播種から約1ヶ月後に中耕培土を実施するとともに、適宜薬散を行った。

畦間 70cm×株間 13cm、畦長 1.5m×3 畦を試験区として中央の 1 畦の前後を除く個体を調査区とした。

③青立ち程度の調査方法

青立ち程度については、圃場において立毛状態で成熟期における各個体の青立ち程度を、以下の通り、Yamada et al. (2014) の基準に基づいて 0~5 の 6 段階で評価した。0: 葉身および葉柄は脱落し、茎は乾いて褐色を呈する。1: 葉身および葉柄は脱落し、茎に水分が残り黄色を呈する。2: 葉身および葉柄は脱落し、茎に水分が残り黄緑色を呈する。3: 葉身および葉柄は脱落し、茎は水分が残り鮮やかな緑色を呈する。4: 大部分の葉身は脱落するが葉柄は一部残る、茎に水分が残り鮮やかな緑色を呈する。5: 大部分の葉身が残り、茎に水分が残り鮮やかな緑色を呈する。系統の評価については、群落内で最も一般的な青立ち程度を基準に、より青立ち程度の高い個体が含まれる場合は一段階高く評価した。

④サンプリング方法

莢の最大肥大期 (R6) に、子葉節の上側の 1 節分を圃場で切り取り、液体窒素で凍結し、凍結乾燥後、代謝産物と元素分析に用いた。

(2) 結莢期の莢切除 RIL 系統の茎の代謝産物と養分元素の網羅的解析

(1) の試験で得られた茎サンプルについて、凍結乾燥後、微粉碎し、代謝産物分析および養分元素分析に供試した。

代謝産物の網羅的分析については、Okazaki et al. (2015) の方法に従い、粉碎サンプルに対しメタノール:クロロフォルム:水混液で代謝産物の抽出をおこない、TMS で誘導体化したあと、GC-MS により代謝産物の測定を行った。代謝産物の同定には NIST データベースを用いた。

元素分析については、Watanabe et al. (2015) の方法に従い、粉碎サンプルについて濃硝酸で熱分解した。この湿式灰化した分解液を ICP-MS により元素分析を行った。

4. 研究成果

(1) RILs 栽培時の青立ち程度と栽培特性の調査および莢切除による影響の評価

①遺伝子型と摘莢処理の効果

3 個の QTL の遺伝子型でグループ分けした RILs について、2013 年および 2014 年の結果からは、摘莢処理の水準間には青立ち程度に有意な差異が認められた (表 2)。一方、QTL の効果については、8 グループ全てをまとめて解析した場合、遺伝子型間に認められた生育特性の差異は限定的であった (データ省略)。個別のグループ間について比較した場合、一部で有意な差異が認められたものの、一貫した傾向は認められず、遺伝子型よりも

摘莢処理が青立ちに寄与したと考えられた (表 2)。今回の試験の主要な目的である青立ち程度が異なるサンプルを作成することは達成したと考えられた。

表 2 RILs の遺伝子型および摘莢処理に対する生育特性 (2013 年, 2014 年)

遺伝子型グループ	摘莢割合 (%)	青立ち (0-5, 2013)	青立ち (0-5, 2014)	処理水準内青立ち平均 (2013)	処理水準内青立ち平均 (2014)	標準偏差 (2013)	標準偏差 (2014)
1		3.3	2.8				
2		2.3	2.3				
3		3.0	2.7				
5	0	2.7	2.2	3.0	2.4	0.81	0.82
4		2.7	1.7				
6		3.3	2.7				
7		3.7	2.2				
8		2.7	2.5				
<hr/>							
1		4.0	3.3				
2		3.3	3.0				
3		4.0	4.0				
5	50	4.3	3.5	4.0	3.4	1.00	1.03
4		3.3	2.0				
6		5.0	4.0				
7		4.7	3.8				
8		3.7	3.5				
<hr/>							
1		5.0					
2		4.7					
3		4.7					
5	100	5.0		4.9		0.34	
4		4.7					
6		5.0					
7		5.0					
8		5.0					

いづれの処理水準間についても 1% 水準で有意差あり。

摘莢処理の効果について、2013 年の試験からは、青立ち程度について各水準間に有意な差異が認められた (表 2)。また、50%摘莢処理を行った場合に、青立ち程度について全系統の標準偏差が最大となり、QTL 遺伝子型から期待される青立ち程度の順位に概ね適合していたこと等から (表 2)、50%摘莢処理がメタボローム解析用のサンプルを採取するために適していると予想された。2014 年の試験についても同様に、50%摘莢処理区と無処理区の間には青立ち程度について有意な差異 (50%摘莢区が高い) が認められた (表 2)。青立ち以外の生育特性では、タンパク含有率 (「タチナガハ」型が高い)、脂質含有率 (「東北 129 号」型が高い)、100 粒重 (「タチナガハ」型が大きい) について有意な差異が認められ (データ省略)、これらの傾向については、Yamada et al. (2014) の qGDS1 について遺伝子型が異なる系統間の傾向と一致していた。

qGSD3 の効果については、無処理区について 8 グループ全てをまとめて解析した場合でも、主茎長についてのみ遺伝子型間に有意な差異 (「東北 129 号」型が長い) が認められ (データ省略)、早晩性が生育特性へ及ぼす効果が大きいと考えられた。qGSD1 の遺伝子型について「タチナガハ型」であるグループのみで解析した場合には、主茎長 (「東北 129 号」型が長い)、倒伏程度 (「東北 129 号」型が大きい)、およびタンパク含有率 (「タチナガハ」型が高い) に有意な差異が認められた (データ省略)。これらの差異は、主に早晩性遺伝子座である E3 座の効果 (Watanabe et al. 2009, Yamada et al. 2014) であると考えられた。

qGSD1 の効果については、無処理区で 8 グループ全てをまとめて解析した場合、および

qGSD3 (E3) が「東北 129 号型」であるグループについて解析した場合に、全糖含有率について、「タチナガハ」型が有意に高い値を示した (データ省略)。

qGSD2 の効果については、無処理区でその他 2 個の QTL の遺伝子型を固定した場合でも一貫した傾向は認められない (データ省略)。但し、一部のグループ間については、100 粒重に有意な差異が認められた (データ省略)。

(2) RILs の結莢期に茎の代謝産物と養分元素の網羅的解析と青立ちのとの関係性

① 茎の代謝産物の網羅的解析と青立ちのとの関係性

メタボロミクス解析を 2013 年度のサンプルについて行った。(1) でも示したが、各 RILs の摘莢率と青立ち発生程度をみると、摘莢率が高まると青立ち指数も高まる傾向にあるが、各グループによって摘莢率と青立ち発生程度の関係は異なり、東北 129 号の QTL が多く組合わさったものが青立ち抵抗性が強い傾向にあると推定された。このときの各 RILs での茎の代謝成分について主成分解析をおこなった結果、主成分 1 の値が大きくなると、青立ち程度も大きくなることから、主成分 1 が青立ちに影響を与えていると考えられた (図 1)。

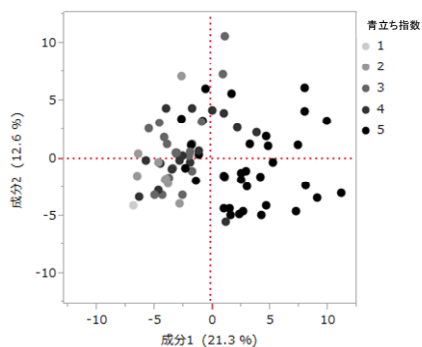


図 1 代謝成分の主成分解析のスコアプロット (0-50%摘莢率)

主成分 1 のスコアと青立ちの関係を見ると正の相関がみられたことから、主成分 1 は強く青立ち指数と関係があることが示された (図 2)。

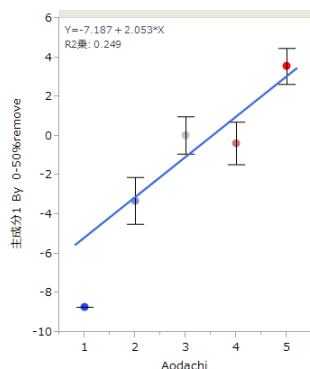


図 2 青立ち指数と主成分 1 との関係 (0-50%摘莢率)

このことから主成分 1 に係わる代謝産物の寄与率について図 3 に示した。主成分 1 への代謝産物の寄与率はアミノ酸や有機酸が高いことがわかった。青立ち程度が高い場合、アミノ酸代謝が高まることにより、アミノ酸の炭素骨格の供給源となる TCA 回路の活性も付随して高まったものと考えられた。

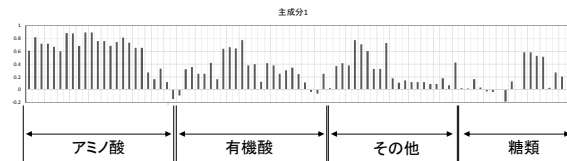


図 3 主成分 1 に対する代謝成分の寄与率 (0-50%摘莢率)

② 茎の養分元素の網羅的解析と青立ちのとの関係性

2013 年のサンプルについて、ICP-MS を用いてイオノミクス解析をおこない、27 元素について測定することができた。このときの各 RILs での茎の元素含有率について主成分解析を行った。その結果を図 4 に示した。

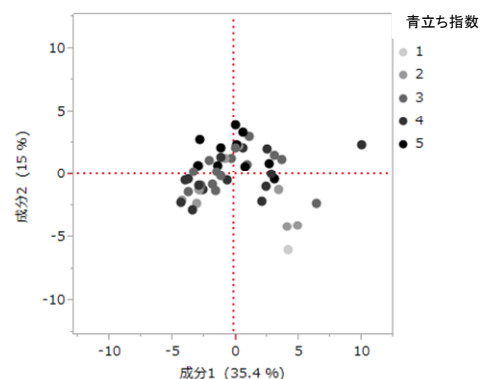


図 4 茎元素含有率の主成分解析のスコアプロット (0-50%摘莢率)

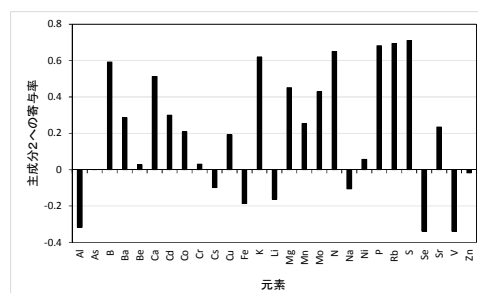


図 5 主成分 2 に対する代謝成分の寄与率 (0-50%摘莢率)

主成分 2 の値が大きくなるほど青立ち指数が大きくなる傾向にあった。主成分 2 が青立ちと関係があることが考えられた。このときの主成分 2 に関与する元素含有率の寄与率をみると N, P, K, B, S 等の元素の寄与率が高かった (図 5)。

しかし、主成分 2 と青立ち指数には強い正の相関が見られなかったことから、PLS 解析をおこない、青立ちと元素含有率の関係につ

いて改めて解析をおこなった。PLS 解析による元素含有率から予測される青立ち指数とその実測値との関係には正の相関がみられた (図 6)。そのときの変数重要度は N, P, Mg, S, B, Mo 等で高かった。主成分分析と PLS 解析から、N と P が青立ちと関係が高いことが示された(図 6)

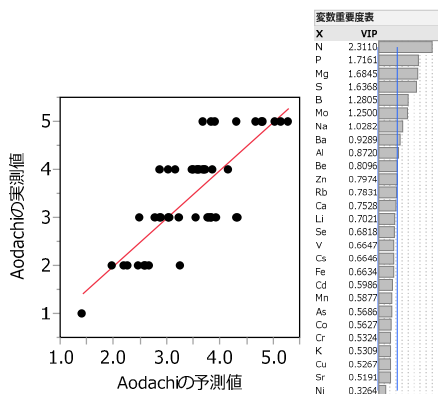


図 6 PLS 解析による元素含有率から予測される青立ち指数と実測値との関係とその変数重要度 (VIP 値)

青立ちの発生により、シンクソースのバランスが崩れ、子実よりは茎葉に養分が転流し、NやPの含有率が茎で高まったと考えられた。

<引用文献>

- 古屋ら (1988): *ダイズ成熟異常個体の地上部諸器官の成熟経過について* 日作紀, 57, 1-7
- 羽鹿 (2005): *ダイズ青立ち症状の発生に関する遺伝的解析* 日作紀, 74(別 1), 380
- 農林水産省 (2006): *大豆をめぐる事情*: www.maff.go.jp/j/study/daizu_gensanti/01/pdf/ref_data.pdf
- Okazaki et al. (2016): *Discovering metabolic indices for early detection of squash (*Cucurbita maxima*) storage quality using GC-MS-based metabolite profiling.* Food Chemistry, 196, 1150-1155.
- Watanabe et al. (2009): *Mapbased cloning of the gene associated with the soybean maturity locus E3.* Genetics, 182, 1251-1262.
- Watanabe et al. (2015): *Application of ionomics to plant and soil in fields under long-term fertilizer trials.* Springerplus, 4, 781. doi: 10.1186/s40064-015-1562-x.
- 山田ら (2011): *ダイズ青立ちに寄与する QTL 育種学研究*, 13(別 1), 122
- Yamada et al. (2014) *Major QTLs associated with green stem disorder insensitivity of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)* Breeding Science, 64, 331-338.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 7 件)

岡崎圭毅, 中村卓司, 田中福代, 大脇良成, 岡紀邦 *土壌容量がダイズの代謝プロファイルに及ぼす影響* 2016. 9. 20, 日本土壌肥料学会, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市)

中村卓司, 山田哲也, 渡部敏裕, 岡崎圭毅 *RILs を用いた大豆青立ち耐性の解明 1. 包括的要素分析による解析* 日本土壌肥料学会, 2016. 9. 20, 佐賀大学 (佐賀県佐賀市)

岡崎圭毅, 中村卓司, 田中福代, 岡紀邦 *土壌の加湿処理がダイズの代謝プロファイルに及ぼす影響.* 日本土壌肥料学会, 2015. 9. 9, 京都大学 (京都府京都市)

中村卓司, 岡崎圭毅, 山田哲也 *RILs を用いた大豆青立ち耐性機構に関わる代謝産物の解析,* 日本作物学会 2015. 3. 27 日本大学 (神奈川県藤沢市)

岡崎圭毅, 中村卓司, 岡紀邦, 大友量, 杉戸智子, 信濃卓郎 *作物の生産性向上に関わる成分分析 1. 代謝産物解析の利用,* 日本作物学会, 2014. 3. 29, 千葉大学 (千葉県千葉市)

中村卓司, 林怜史, 村上則幸, 辻博之, 小松邦彦, 岡崎圭毅, S. Zimin, Q. Chu, 渡部敏裕 *作物の生産性向上に関わる成分分析 2. 大豆生産性と子実元素との関係* 日本作物学会, 2014. 3. 29, 千葉大学 (千葉県千葉市)

岡崎圭毅, 信濃卓郎, 中村卓司, 岡紀邦 *水ストレス条件下における堆肥施用がダイズの代謝プロファイルに与える影響* 日本土壌肥料学会, 2013. 9. 11, 名古屋大学 (愛知県名古屋市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 卓司 (Takuji Nakamura)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター水田作研究領域・グループ長

研究者番号: 60399425

(2) 研究分担者

岡崎 圭毅 (Keiki Okazaki)
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・土壤肥
料研究領域・主任研究員
研究者番号：40414750

山田 哲也 (Tetsuya Yamada)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・次世代作物開発研究センター畑
作物研究領域・主任研究員
研究者番号：60414653

(3) 連携研究者

信濃 卓郎 (Takuro Shinano)
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農業放射
線研究センター・センター長
研究者番号：20235542

福崎 栄一郎 (Fukusaki Eichiro)
国立大学法人 大阪大学・工学(系)研究
科・教授
研究者番号：40273594

(4) 研究協力者

渡部 敏裕 (Toshihiro Watanabe)
国立大学法人 北海道大学・農学部・准教
授
研究者番号：60360939