

研究報告書

「フィールドでの非破壊元素動態モニタリング技術の確立と時空間動態解明」

研究タイプ： 通常型

研究期間： 2016年10月～2020年3月

研究者： 神谷 岳洋

1. 研究のねらい

植物が育つには無機必須元素が必要であり、無機必須元素の主な供給源は土壌である。植物の栽培に適した養分に富んだ土壌は少なく、我々人類は多くの場合には施肥により栄養分を補填し、収量を保っている。一方で、施肥には多くのコストがかかること、過剰投与による環境汚染を招くなどといった問題がある。これらの問題を解決するには、土壌中の栄養を効率的に吸収・利用できる作物の育種、栽培法の確立による、必要最小限の肥料による効率的な作物栽培が必要である。そのためには、実際の栽培環境における植物の元素輸送システム、すなわち、植物の元素動態とそれに関与する環境的要因・遺伝的要因ならびにそれらの相互関係を明らかにする必要がある。そこで、本研究では、フィールドで利用可能な無機必須元素の非破壊モニタリング技術の確立ならびに圃場での時空間的な元素動態に関与する分子機構を解明することを目的とする。

具体的には、ハイパースペクトルカメラを用いた植物の元素動態の非破壊モニタリング技術の開発を行なう。ハイパースペクトルカメラにより得られたスペクトルデータとICP-MSにより得られた精度の高い元素濃度のデータから、元素濃度推定モデルを回帰分析によって作成し、時空間的に高解像度で元素動態を捉える。加えて、実際の作物の栽培環境での実証試験を行う。また、ハイパースペクトルカメラを用いて、実際の作物の栄養診断にも取り組む。並行して、イネやトマトなど実際の作物を用いて、圃場での元素動態に関与する遺伝子の同定を行う。

本研究の大きな目標は、元素動態を圃場において非破壊で観察するこれまでにない技術の創出である。この技術を確立することによって、変動する環境下での作物の栄養状態を時空間的に正確に把握し、これまでは可視化することができなかった植物の栄養状態を捉えることが可能になると考えている。本研究を通して、栄養状態の変化に頑健な栽培技術基盤の創出や、育種基盤の構築を行なうことを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、1)ハイパースペクトルカメラを用いて、植物の元素動態および栄養状態を可視化すること、2)元素動態を司る遺伝子の同定と解析を目的としている。

1)に関しては、トマトの葉および果実における元素推定モデルを Partial Least Squares (PLS) 回帰により作成し、カリウムやリンなど多量必須元素について精度良く推定できるモデルを作成した。栄養診断については、トマトの葉をサンプルとして用いた。窒素、リン、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄、をそれぞれ除いた水耕液で一ヶ月程度栽培した後、葉をハイパースペクトルカメラにより撮影し、PLSにより栽培条件を判別するモデル作成を

行った。窒素とリンを除いて、顕著な欠乏症状は認められない条件にもかかわらず、スペクトル情報をもちいた判別モデルでは、90%近い正解率が得られた。このことは、ハイパースペクトルカメラを用いた栄養診断が実現可能であることを示している。今後、多くの作物で実証するとともに、実際に圃場での栽培に向けた技術の改善が必要であり、継続して研究を進めていく予定である。

2)に関しては、イネにおける変異株の解析、トマトの GWAS、ハクサイの QTL 解析を行った。イネにおいては、コバルトとニッケル、亜鉛とカドミウムを輸送する輸送体の同定、モリブデンの輸送に関与する遺伝子は同定しつつある。モリブデン輸送体は新規の輸送体であり、機能解析を進めている。トマトおよびハクサイに関しては遺伝子座の同定まで行っており、今後遺伝子の同定を進めていく。なお、ハクサイについては企業との共同研究が進んでおり、DNA マーカーの開発を行っていく予定である。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ハイパースペクトルカメラによる植物の元素動態および栄養状態の可視化」

ハイパースペクトルカメラによる撮影のセッティングから行った。ハイパースペクトルカメラは以下の2台を用いた: 400-1100 nm(波長分解能 2 nm); 900-1600 nm(波長分解能 3.3 nm)。なお、光源はハロゲンランプを使用した。撮影するサンプルは、バーミキュライトで1ヶ月程度栽培したトマトの葉を用いた。小葉全体、もしくは、小葉を3-5分割した断片をハイパースペクトルカメラにより観察した。また、ハイパースペクトルカメラの画像から関心領域の波長情報を抽出するパイプラインを作成した。次に、ハイパースペクトルカメラで観察した同じサンプルを ICP-MS による元素分析を行い、以下の元素について信頼できる値を取得した: Li, B, Na, Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr, Mo, Cd。最終的には、8回に分けて栽培したトマトより、計 933 サンプルのハイパースペクトルデータと ICP-MS による元素濃度の情報を得た。これらのサンプルを用いて、外れ値の除去や平滑化などの前処理を行った後、PLS による元素推定モデルの構築を行った。モデルの作成に全体の 75%のサンプルを用い、10 分割クロスバリデーションによりモデルを構築した。次に、モデルの作成に用いていない残りの 25%のサンプルの元素濃度を推定した。その結果、カルシウムで予測値と実測値(モデルの作成に用いていないサンプル)の決定係数が最も高く、 $R^2=0.74$ であった。

上記の回帰に加えて、トマトの栄養状態をハイパースペクトルカメラにより捉えることが可能か検討した。目的は、顕在化する(人の目に見える)前にハイパースペクトルカメラにより欠乏症状を捉えることである。栄養診断は、トマトの葉を用いて行った。通常条件、通常の 10 分の 1の窒素、または、リン、カリウム、硫黄、マグネシウム、カルシウム、鉄をそれぞれ除いた水耕液で栽培し、1ヶ月後、第 3、4 葉をハイパースペクトルカメラにより撮影した。関心領域(ROI)は葉をメッシュで区切った1区画としデータ数を増やした。ハイパースペクトルカメラにより得られた反射スペクトル強度を説明変数として、PLS により栽培条件を判別するモデルの構築を行った。モデルの作成に全体の 75%のサンプルを用い、10 分割クロスバリデーションによりモデルを構築した。次に、モデルの作成に用いていない残りの 25%のサンプルの判別を行った。次に、1枚の葉においてどの条件と判別された ROI が多いかを多数決を取り、1枚の葉の判別を行った。その結果、88%の正解率で、どのような栄養条件で栽培されたかを判別するこ

とができた。

研究テーマB「元素動態を司る遺伝子の同定」

これまでに取得した地上部や玄米の元素濃度が異なるイネ変異株(EMS 変異導入株)を材料として遺伝子の同定を進めた。次世代シーケンサーを用いた遺伝子マッピングにより、新たに4つの変異株について、候補領域と候補遺伝子を同定した。1つ目は、玄米と地上部のCoとNiが高い変異株(1187_n)で、原因遺伝子はこれら元素の輸送体であるOsFPN1をコードしていた。ゴルジ体に局在すること、酵母を用いたCoとNiの輸送活性の測定、変異株の生理的解析から、CoやNiを根のゴルジ体に隔離することにより、これら元素に対して耐性を付与していることを明らかにした。2つ目は、玄米のMo濃度が高くなる変異株(1003_a)で、候補遺伝子は1番染色体の35 Mbにある機能未知の輸送体をコードしていた。硝酸濃度が高い条件で栽培すると生育が抑制されることから、窒素同化に必要なMoを輸送しているものと考えている。現在、CRISPR/Cas破壊株を作成しているところであり、今後も解析を続けて行く予定である。3つ目は玄米でCdとZnが低い変異株であり、その原因遺伝子は既知の遺伝子OsHMA2をコードしていた。4つ目は、カルシウムやナトリウムなど複数の元素濃度が異なる変異株であるが、この系統は遺伝子の逆位がおきており、複数の遺伝子が候補であることが示唆された。また、上記のイネ以外にトマトやハクサイの元素動態に関与する遺伝子座を同定した。

3. 今後の展開

本研究により、ハイパースペクトルカメラを用いた元素動態および栄養状態の可視化が可能であるということを示すことができた。今後は、野外でも可能な技術にすることが必須であると考えている。作物の栽培や栄養診断モデルの作成を実験室内でという制限がつく。つまり、実際とは異なる環境でのモデルは圃場ではうまく機能しないことが予想される。また、本研究ではトマトのみを対象としており、他の作物については個別にモデルを作成する必要がある。このことから、農業試験場や農家など、実際に栽培を行っている方と組んで研究を進めていくことが必要である。また、技術の社会実装という面では、民間企業との連携も必要であると考えている。

2つ目の元素動態に関わる遺伝子の同定に関して、イネにおいて、複数の変異株を単離し、原因遺伝子を同定している。本研究期間内に同定できた遺伝子はCo輸送に関わるものだけであったが、その他に人での欠乏症が問題となっている鉄や亜鉛を多く含む変異株や、人にとって毒性元素であるヒ素濃度が低い変異株も単離している。これらの原因遺伝子を同定し、これら元素濃度を变化させたイネの育種を行っていききたい。トマトおよびハクサイについては、遺伝子座を同定しており、今後は遺伝子の同定およびDNAマーカーの作成を行い、育種へとつながる技術の構築を行っていききたい。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

本研究課題では、(1)野外で使える元素動態モニタリング方法の開発と、(2)植物の元素動態に関する遺伝子の同定に取り組んだ。

(1)に関しては、ハイパースペクトルカメラを用いて、少なくとも実験室内では利用可能なシステムを構築し、元素濃度を推定できることを示すことができた。一方で、このシステムを野外に持ち出すことは技術的に既存の装置では難しかった。そこで、最終年度になってしまったが、野外に持ち出すことが可能な、光源を含む小型の分光センサーでの予測モデルの作成を進めた。窒素について検討を行ったところ、温室で栽培しその場でセンサーを用いて測定した場合に、センサーによる予測値とCNコードによる窒素の実測値の決定係数が0.57と比較的高い値が得られ、応用への一歩を踏み出すことができた。

(2)に関しては、期間内に複数の元素濃度が異なるイネ変異株の原因遺伝子を同定し、一定の成果は得られたものと考えている。一方で、トマトやハクサイに関しては遺伝子座の同定までは進んでいるものの、イネやシロイヌナズナと比較すると実験材料や実験技術が整っていないことから、遺伝子の同定には至らなかった。この点は見通しが甘く反省するとともに、今後の解析が必要である。

本研究は、私以外に、博士課程後期大学院2名(2名とも留学生)、実験補助者1名で進めた。学生は2名ともイネの変異株の解析を行い、うち1名は、イネのCoや複数の元素が異なる変異株を解析し、2019年9月に学位を取得した。研究のみならず教育にも貢献できたと考えている。

本研究の内容は、私にとってさきがけで取り組んだ新たなテーマであり、本研究費のおかげで、新たな領域に挑戦することができた。当初の目的を達成できていないところもあるが、研究内容を学会で発表することにより、研究内容に興味をもていただいた研究者や企業があり、今後、共同研究や新たな研究費を獲得し、基礎研究のみならず、応用研究を展開して社会実装につなげていきたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Kan M, Yamazaki K, Fujiwara T, Kamiya T*. (2019) A simple and high-throughput method for xylem sap collection. *BioTechniques*, 67, 242-245, 2019.

*corresponding author.

(2)特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Takehiro Kamiya, Nobuhiro Tanaka, Toru Fujiwara. Ionic screening of EMS-mutagenized rice. International Plant Nutrition Colloquium 2017, Copenhagen, Denmark
2. Manman Kan, Toru Fujiwara, Takehiro Kamiya. Golgi-localized OsFPN1 is required for cobalt and nickel homeostasis in rice 第60回日本植物生理学会年会、2019年、名古屋

屋大学

3. 神谷岳洋、反田直之、藤原徹 ハイパースペクトルカメラを用いた元素動態の可視化技術の確立 日本土壤肥料学会 2017 年度仙台大会、2017 年、東北大学
4. 神谷岳洋、反田直之、藤原徹 ハイパースペクトルカメラを用いた植物の栄養診断 日本土壤肥料学会 2018 年度神奈川大会、2018 年、日本大学
5. 神谷岳洋 ハイパースペクトルカメラを用いた作物の栄養診断 日本土壤肥料学会 2019 年度静岡大会 シンポジウム(招待講演)、2019 年、静岡大学