

研究報告書

「農作物の早期診断技術の創出と栽培法の最適化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 12 月～平成 31 年 3 月

研究者: 野田口 理孝

1. 研究のねらい

人類活動による環境変動は、温暖化に伴う農作物の至適栽培エリアの北上や局所的な異常気象の頻度を上昇させ、従来の農業体系が通用しないケースが増えつつある。地球規模の持続可能な環境保全への取り組みには心血が注がれているものの、速やかな解決は難しく、今後も変動が続くとされる地球環境に随時対応できる農業技術の確立が求められている。本研究では、植物がいかなる生育状態にあるかを、見た目には評価できない初期の育成段階から、一枚の葉から得られる搾汁液により診断する技術を開発し、その後の育成に適正な栽培条件を予測する技術の提供を目指す。農作物の生育状態の判定や栽培法の選定は、農家の経験に頼るところが大きく、農業主の高齢化によりその経験は失われる危険性にある。見た目に症状が現れる前に生育状態を診断できる本技術は、現状のリスクを軽減できる。

個体全体の生育を記述する方法として、本研究では植物の篩管内の情報シグナルに着目した。篩管は、光合成によって得たエネルギーを全身に伝達する組織であるが、同時に個体発生を制御する情報シグナルを輸送していることが近年の研究で明らかとなってきた。そのため、篩管を解析すれば、入手困難であった個体レベルの生育状態を調べることができる。篩管中を輸送される生体情報分子としては、これまでに small RNA, mRNA, タンパク質、植物ホルモン等の多様な分子種が知られる。そこで本研究では第一に、これらの構成成分を圃場でその場診断することのできるデバイスを開発することを目的とした。第二に、生体診断の精度そのものを向上させる目的で、篩管中の生体情報分子のカタログ化を目指した。これにより、[1]フィールドにおける環境・栽培法といった農業形質を左右する外的要因と、[2]収穫量・作物品質等の最終の農業形質の2群の情報に対し、篩管成分を作物の生体情報を表す3群目の情報として照合し、特定の環境下で働く情報分子あるいは分子集団の傾向を検出することができる。

診断技術を用いて、対象農作物の圃場における課題を早期にその場診断することができれば、その後の栽培法を適正化し、環境負荷に負けずに農作物を栽培できる。また中長期的な新品種開発においても、早期診断技術は有効なスクリーニング法となりえる。篩管液による診断技術は、植物が普遍的に利用する情報伝達機構を基盤とするため、植物の種類によらず汎用的に利用可能であると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究に於いては、診断技術の要素開発(デバイス、篩管液の情報整備)を目標に、植物の葉の搾汁液～20 μ L から、2 時間以内に、標的の RNA あるいはタンパク質を検出することのできる植物用診断デバイスの開発を達成した。はじめにマイクロ工学技術 MEMS により少量の植物試料を扱うことのできるマイクロ流体デバイスを作製し、次に植物検体を

扱うのに最適なプロトコルを構築した。検体試料としては、情報分子が集積している篩管液と、篩管液成分を含む葉の搾汁液を試験し、後者の篩管液成分が希釈された葉の搾汁液であっても、標的する情報分子の検出を行うことができた。RNA 分子は、土壌の主要肥料要素であるリンが欠乏した際に発現上昇して篩管液中に検出されるようになる miR399 を扱った。リン欠乏に晒した複数の農作物を用意して、それらの植物の葉の搾汁液から miR399 RNA を検出することができ、リン欠乏状態を簡便に診断することに成功した。肥料要求性の程度は農作物ごとに異なり、また同一の農作物でも成長ステージによって要求性は異なるため、土壌成分の計測だけではさらなる肥料の必要性を判断することは難しかったが、この汎用技術によって課題解消につながる。

次にタンパク質の検出として、植物に感染する植物ウイルス由来タンパク質を検出し、病理診断としての利用可能性を示した。様々な農作物に感染して被害をもたらすキュウリモザイクウイルス(CMV)を対象に実証した。診断デバイスは、RNA 検出の際に用いたものと同一である。見た目の症状から病気と生理障害を見分けることはしばしば困難であり、また病徴からいずれの病気であるかを調べることも容易でない。本技術によれば、こうした場面で簡便に短時間に症状の原因を診断することができる。

以上、様々な農作物を対象に、10 円玉程度の葉片から、短時間に簡便に生体診断を行える要素技術を開発した。

本研究ではさらに、将来的な技術展開のため、篩管液中の情報シグナルの分子同定を進めた。情報分子の中では特に RNA が技術的な利便性・拡張性・汎用性が高いことから、RNA を対象に解析パイプラインの構築と同定を行なった。農作物としてはモデル化の進むトマトを対象に研究を進め、篩管液中に含まれる RNA 分子の包括的なカタログ化を達成した。診断デバイスと組み合わせて使用すれば診断精度の向上につながり、本研究の一連の成果により植物の診断技術のプラットフォームを構築することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「植物用生体診断デバイスの確立」

・デバイス作製

低ボリウム検体試料を扱うため、MEMS 技術によりマイクロ流体デバイスを作製した(図 1A)。マイクロ流路の両端に、検体試料の導入部と送液操作のための吸入部を設け、流路内の一部に標的分子の検出領域として、プローブを固相化した領域を設けた。シグナル検出の有意性を評価するため、検体試料の導入部のすぐ先で流路が 5 岐路に分岐する構造とし、検出反応を 5 反復する形態とした。送液操作のため、外部装置としてシリンジポンプを設置し、実験ごとに吸引部に装着した。

・デバイスによる RNA 検出

リン酸欠乏時の情報伝達に働く miR399 を対象に研究を進め、miR399 を検出する蛍光標識付き DNA プローブを設計・合成して、診断デバイスの作動試験に用いた。はじめに人工合成した miRNA を用いて条件検討を行った。超純水で希釈系列を用意して調べたところ、1 nM の濃度までであれば標的 miRNA を再現性高く、有意に検出できることが分かった(図 1)。

次に、植物検体から標的 RNA 分子を検出することを念頭に、人工合成した miRNA を超純

水の代わりに葉の搾汁液に溶解して、検出実験を行った。真正双子葉類を二分するキク類とバラ類から、それぞれトマトとシロイヌナズナを試験対象として汎用性を確認した。いずれの植物の葉の搾汁液を用いた場合も、有意に標的 RNA 分子を検出できることが分かった。

そこで最終的に、植物体内で産生するの miRNA の検出を試みた。リン酸欠乏状態においた植物個体と欠乏処理しない植物個体を用意し、検出試験を行った。RNA の発現量を定量評価する従来法である qPCR 法により、調整した植物が実際に miR399 をリン欠乏に応じて発現上昇させているかを確認し、同時に調整した試料を診断デバイス実験に用いた。その結果、診断デバイスでも葉の搾汁液から有意に miR399 の発現上昇を検出することに成功した。なお、篩管液を開始試料として調整した場合には、篩管液の凝固反応による操作の難しさが明らかとなり、葉の搾汁液を開始試料として用いることが好ましいことが分かった。

・デバイスによる植物由来のタンパク質の検出

デバイスによる植物由来のタンパク質の検出の試みについては、キュウリモザイクウイルスに感染した植物個体、及び、非感染個体と、キュウリモザイクウイルス由来性タンパク質を認識する特異的抗体とを用いて検討を行った。検討の結果、非感染個体からは認められない抗体反応によるシグナルが、感染個体からは有意に検出され、デバイスによる植物体内ウイルス性タンパク質の検出に成功した。

以上、植物の RNA あるいはタンパク質を、少量の葉片から検出することが可能な「診断デバイス」を開発し、第一の研究目標を達成した。

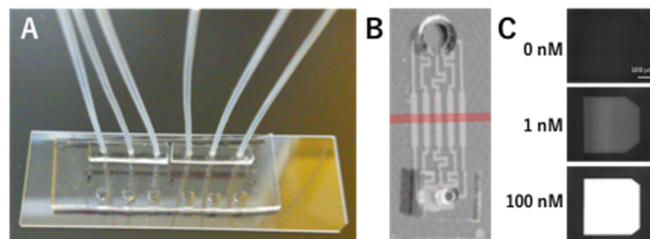


図 1. 診断デバイス

A 診断デバイスの全形. B サンプル用の検出ユニット (赤色：プローブ領域). C RNA の検出の様子.

研究テーマ B 「篩管中の生体情報分子のカタログ化」

・圃場試験の準備

特定の環境要因のもとで栽培した農作物の篩管液構成成分を解析する目的で、圃場で育成したトマトを材料とした。土壌肥料成分を欠乏した際の応答を調べることを予定していたため、肥料濃度を正しく調整するための水耕装置を内装したビニールハウスを設営した。

トマトの情報シグナルを同定するため、トマトに *Nicotiana benthamiana* を穂木として接木し、*N. benthamiana* 穂木をサンプリングして、そこからトマト由来の情報シグナル分子を同定することにした。この手法であれば、*N. benthamiana* 穂木に伝達したトマト由来のシグナル分子を、2種類の植物のゲノム情報の違いを指標にして網羅同定することができる。はじめに、圃場で栽培したトマトの適切な接木法を確認し、続く本実験を実施した。

・トマトのハウス栽培と試料調整

春作と秋作の二期の作付けを実施した。栄養リッチ区と主要栄養素 N, P, K をそれぞれ欠乏した区を用意し、試料調整を行った。栄養欠乏の処理は、播種後四ヶ月栽培した後から開始し、一週間連続して行った後にサンプリングを行った。サンプリングは、(i) 各処理区にお

けるトマトの応答を調べるためトマトの成熟葉と、(ii)移行性 RNA 検出の実験のためサンプリング一ヶ月前にトマト固定種 MoneyMaker 系統に接木した *N. benthamiana* 穂木と、(iii)元素分析用のトマト葉と、(iv)各処理区における肥料成分を調べるための排液について実施した。(i)–(iii)は、9 個体分を集めて 1 サンプルとしたものを 3 反復用意した。なお、ハウス栽培したトマトだけではなく、環境制御された室内で栽培したトマトについても試料を調整し、室内と野外のいずれでも共通する機構を調べられるようにした。

・篩管内移行性 RNA 同定のための RNA-Seq 解析

一連の接木試料について、illumina NEXTseq により、1 億リード/試料を目安として RNA-Seq 解析を行った。得られたリードは、トマト cDNA データベースにマッピングし、完全一致するものを抽出した。トマトに接木した *N. benthamiana* 穂木サンプルの対象区として、接木をしていない *N. benthamiana* サンプルのデータも並列して扱い、*N. benthamiana* 穂木のサンプルからだけ抽出されるリードを抽出し、次項の解析パイプラインに供試した。

・篩管内移行性 RNA 同定の解析パイプラインの構築

移行性 RNA を同定する有効な解析パイプラインがこれまでに存在せず、自前で構築した。公表されている手法では多量の偽陽性が得られることが明らかとなり、複数の SNP を指標とする厳しい評価基準を設けた解析パイプラインを用意した。この方法によると、偽陽性の検出は殆ど皆無で、移行性 RNA だけを同定できた。近日、データベースとして公開予定である。

・篩管内移行性 RNA の同定

構築した解析パイプラインで解析した結果、栄養リッチ区で 53 種類、N 欠乏区で 38 種類、P 欠乏区で 59 種類、K 欠乏区で 49 種類、重複を除いて計 244 種類の移行性 mRNA を同定することができた(図 2)。

以上より、診断技術の精度向上へ向けた基盤情報の整備として、篩管中の RNA シグナルの網羅的なリストを作成することができ、第二の研究目標を達成した。

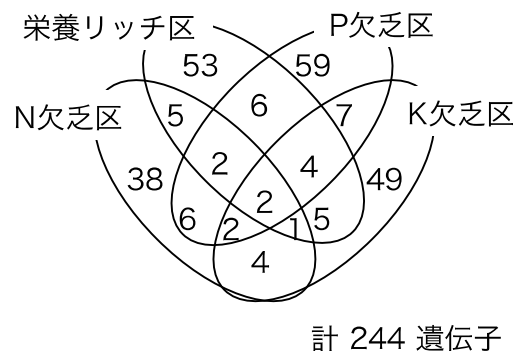


図 2. トマトの篩管内移行性 RNA

栄養リッチ区、N 欠乏区、P 欠乏区、K 欠乏区でそれぞれ同定された篩管内移行性 RNA の数をベン図で示す。

3. 今後の展開

・診断技術の実用化

診断技術のスループットをより向上させて実際の基礎科学研究の場面や実用場面で利用できるようにするため、周辺装置開発を含めた発展研究を実施する。開発項目は 3 点あり、送液操作を自動で行う小型装置の開発、検出用の光学系システムの開発、そしてそれら装置の仕様に適合する量産型の診断デバイス生産である。作成した診断デバイスが長期保存できるものであるかも実用性を考えると重要な開発項目である。当面は開発コストが大きくなったとしても、技術実証を重ねることに重点を置き開発方向性を探る。開発方針が定まった段階で、素材や装置パーツの低

コスト化を図り、最終的に社会受容可能な装置を開発する。必須ではないが、いくつかの技術レベルで装置が開発されることが多面的な技術活用には好ましく、安価でそれほど高精度でない装置から、それほど安価でなくとも高精度に診断可能な装置までがラインナップできると最善である。開発工程の中で、こちらにも念頭にデータを取得する。

・新たな診断マーカーの開発による技術有効性の実証

既に生育診断の指標となる生体分子マーカーは知られるが、まだまだ限られたことしか診断することはできない。本診断技術は、大規模にデータ収集することを得意とし、そのような生体診断に有効なマーカー開発の際には有効である。この有効性を実証するため、いくつかの診断ニーズのある現象について技術を適用し、成果を得ることで技術の有効性を実証したい。安定した農作物の生産を実現するため、農業では本質的な問題となる病気や成長生理について標的したい。病気にかかりやすい状態でないか、生育不良の兆候がないかを、定期健康診断できて、農業生産者が収穫期まで確信を持って農作業するための技術へと発展させたい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

本研究では、圃場生態系における農作物の生育状態を、篩管液の移動性分子を解析することで診断するための要素技術を確立することであった。植物の生体分子の検出技術はこれまで実験室環境で専門家が数日を要して行っており、簡便な検出技術が望まれていた。本研究では特殊な研究設備を必要とせず、植物試料から短時間で簡便に生体内の RNA、タンパク質を検出することのできる新たな診断技術を開発し、土壌肥料の欠乏状態の診断と病理診断に成功した。

くわえて本研究では、圃場環境での生育状態の診断にあたって有用な分子マーカー候補を同定すべく、篩管液の移動性分子をトマトを対象に同定し、基盤情報を整備することを目指した。期間を通して解析に必要な試料調整を行い、生体診断の際に指標となる篩管内のシグナル分子の同定のための解析パイプラインを新規に構築し、トマト篩管移行性 RNA のカタログ化とデータベース構築を達成した。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

第1年次は実験の実施全般に必要な超純水製造装置 300 万円を購入し、以後のデバイス実験、分子生物学実験において、十分に高精度な解析結果を得ることができた。第3年次は、水耕栽培設備と暖房装置を内装したビニールハウスを設営し、冬場を含む年間を通して移行性 mRNA の解析に必要な植物試料を調整することができた。研究実施期間全体を通して、デバイス開発用の部材費、試薬費、分子生物学実験用の試薬費が研究費の半分近くとなった。十分な開発費が利用できたことで、診断デバイスの技術確立と、篩管内移行性 mRNA の網羅同定を達成することができた。第2年次から第4年次までは、技術補佐員を 2～3 名雇用し、人件費として年間 600 万円を費やした。研究実施に必要な人的リソースを確保することができたため、圃場での栽培試験や試料調整、実験に使用する十分なデバイス作製を、研究実施期間を通して行うことができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究が成功すれば、植物でははじめての生育状態の早期診断技術となる。植物に普遍的な情報伝達の機構を指標に診断する方法のため、汎用性が高く、圃場で育つ植物にもその場診断

が実現し、早期に診断することで今後の栽培法の修正にも役立つ。環境情報や作物情報を集積する技術との協働により、生体診断のための基盤情報が整備できれば、所望の形質を有する接木苗・品種の探索は迅速化し、将来の予測困難な気候変動にも対応が可能となる。植物科学の推進にも有効であり、研究者が個人のレベルであっても短期間でハイスループットにデータ取得することができ、研究の多様性が高まればと期待している。本技術は、農業の高度化を促進する利便性の高い農業技術となる可能性があり、安全な社会実現へ向けた国際的な貢献が期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hirokazu Toju, Koji Okayasu and Michitaka Notaguchi. Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Scientific Reports*. In press.
2. Hiroki Tsutsui, Michitaka Notaguchi. The use of grafting to study systemic signaling in plants. *Plant Cell Physiology*. 2018, 58, 1291–1301.
3. Ryushiro D. Kasahara, Michitaka Notaguchi and Yujiro Honma. Discovery of POEM phenomenon, a new step of plant reproduction. *Communicative Integrative Biology*. 2018, 10, e1338989.
4. Ryushiro D. Kasahara[†], Michitaka Notaguchi[†], Shiori Nagahara, Takamasa Suzuki, Daichi Susaki, Yujiro Honma, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama. Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Science Advances*. 2016, 2, e1600554. [†]Co-first.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(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)

・学会発表

Ryo Okada, Naoki Yanagisawa and Michitaka Notaguchi. A fluidic micro-device to detect RNAs and proteins for early diagnosis in plants. The 5th International Plant Phenotyping Symposium. 2018.

・受賞

第 6 回超異分野学会本大会 超異分野学会賞

第 35 回電気学会 センサ・マイクロマシン部門 優秀ポスター発表賞

・著作物

Koji Okayasu and Michitaka Notaguchi. Efficient establishment of interfamily heterograft of *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana*. Phloem: Methods and Protocols. Springer. In press.

野田口理孝. 異種間の接ぎ木技術の開発. アグリバイオ. 特集 植物の増殖技術と生産
(細胞培養や接ぎ木利用). 2018. 2, 1043-1047.

・新聞報道

朝日新聞(2018.7.1) 先端人「接ぎ木 食糧危機救う」