

GC/MSメタボロミクスを利用した農作物の生育・品質診断法開発に向けた取り組み

Metabolomics approach for improving productivity and quality of agricultural products using GC/MS

岡崎 圭毅

Keiki OKAZAKI

農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業研究センター

1. はじめに

農産物の品質は、美味しさ、栄養性、機能性などによって決定されるが、農産物を植物として捉えた場合、その中で行われている代謝が重要な鍵を握っていると考えられる。本報告では、メタボロミクスの手法として広く普及しているガスクロマトグラフィー質量分析計（GC/MS）を用いた代謝産物プロファイリング法を用いた事例を紹介する。この手法は、作物体内の糖・有機酸・アミノ酸等の成分を対象とする方法であり、質量分析計により得られる多次元データと多変量解析の組み合わせにより有効な情報を引き出すものである。本方法の適用により、農産物の質の制御につながる指標の探索や、主要成分の差分解析を容易に実施することができ、高品質な農産物や食品を生み出す技術開発に貢献するものと期待される。

2. GC/MS メタボロミクスの概要

GC/MS による水溶性成分の分析法は、数あるメタボロミクス分析法の中で最も早期に手法が確立され既に多くの成果が創出されている方法で、糖・有機酸・アミノ酸などの低分子成分を誘導体化し、1回の分析でこれらを同時に測定できる方法である^{1,2)}。前処理に時間がかかるが、他の手法と比較して汎用性、安定性に優れている面で定評がある。また、分析のプロトコール類、マススペクトルデータベース、GC/MS データ用解析ツールの多くが無償で公開されていること、装置が質量分析計の中では安価で汎用的である点など、手法を導入する際の障壁が低い。最近は誘導体化すること無く分析が可能な LC/MS や CE/MS などの手法が適用される事例も多くなつたが、広範囲の低分子成分の解析を 1 回の測定で達成できる GC/MS の特性は、なお一定の価値があると考える。

3. 水耕ホウレンソウの窒素栄養応答

作物の品質を制御する上で、窒素栄養条件は主要な要因の一つとして位置づけられている。植物では多くの代謝物が窒素欠乏やアンモニウム過剰障害に対して応答を示すことが知られているが、品質制御において有用な非ストレス条件下において、窒素栄養に対する代謝物の量的応答を包括的に調査した事例は少ない。そこで、水耕栽培した ホウレンソウを供試し、培養液の窒素濃度が葉身の糖・有機酸・アミノ酸組成に与える影響を調査した。ホウレンソウから 51 代謝産物が検出された（図 1）。各代謝産物のピーク面積値の相対値を用いて主成分分析を行ったところ、スコアプロットにおいて窒素処理の違いにより異なるクラスターが形成され、代謝物の組成に窒素処理が大きな影響を与えることが示された³⁾。多くの代謝産物の濃度はホウレンソウの全窒素含有率と有意に正もしくは負の相関関係にあった。高窒素濃度では多くの糖類が減少する一方、アミノ酸、TCA 回路の有機酸、ケイ皮酸などは増加していた。また、同様の方法で培養液の NH₄-N/NO₃-N 比率がホウレンソウの代謝物に与える影響を調査したところ、高 NH₄-N 条件において、アミノ酸濃度が高まり、有機酸濃度が低くなることを明らかにした⁴⁾。

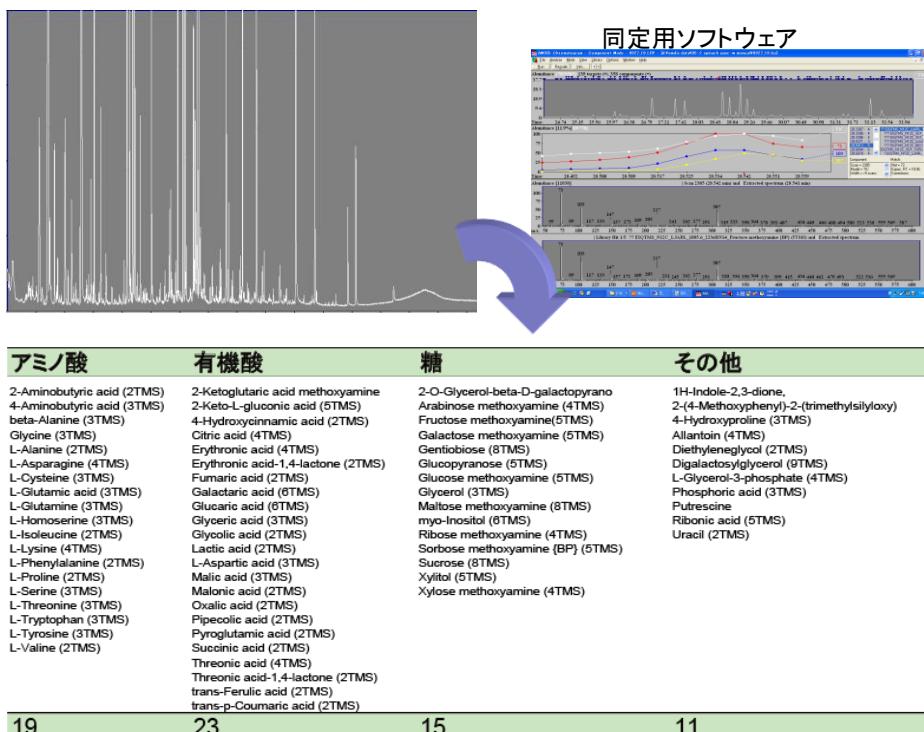


図 1 ホウレンソウにおいて検出された代謝産物

4. 露地栽培コマツナにおける成分変動要因

高品質な農産物を生産する上で、堆肥などの有機物を利用した土作りは有効であると考えられているが、その効用には多面的な要因が関与するため、品質と有機物施用の関係解析は困難と捉えられてきた。そこで、メタボロミクスの適用により、有機物に対する植物の応答を指標化し、要因推定に繋げるため、圃場試験によりコマツナを栽培した。試験設計は fractional factorial design 法を適用し、牛糞堆肥、麦わら(W)、速効性窒素肥料、緩行性窒素肥料(Ns)、リン酸(P)、カリウム(K)をそれぞれ 3 水準設定した。コマツナの葉と葉柄においてそれぞれ 62 と 67 の代謝物を得た。代謝物組成の情報を、主成分分析 (PCA) により解析したところ、第 1 成分は全分散の 44.1%を説明し、窒素と密接な関係を示した。第 3 成分は、全分散の 8.8%を説明し、堆肥施用量の違いを反映した。ANOVA により、個々の代謝物に対する効果が最も高い因子として、N 吸収量、堆肥施用量、緩行性窒素肥料の 3 要因が抽出された。堆肥を施用したコマツナ葉身では、フルクトースおよびキシロースが減少し、コハク酸およびプロトレシンが増加する傾向が見られたが、緩効性窒素肥料などの他の要因においてはこのような傾向は認められなかった (図 2)。以上により、堆肥施用の効果は、窒素吸収(Nabsorb)に対する影響と堆肥独自の効果(M)の 2 要因により、低分子代謝産物の変動の大部分を説明できることが明らかになった⁵⁾。

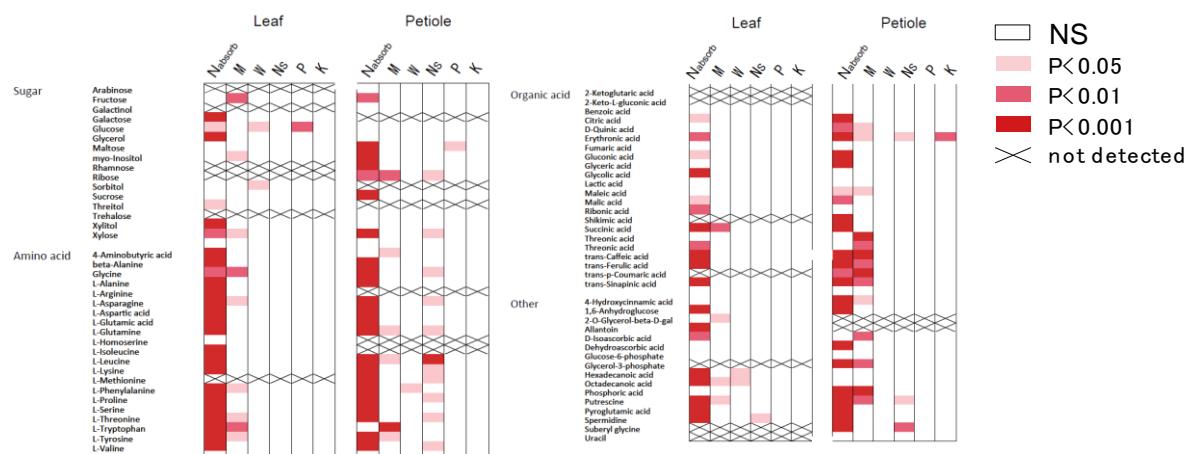


図 2 代謝産物プロファイリングによる堆肥施用の要因解析

網掛けは処理に対して各代謝産物が有意な変動を示したことをあらわす。

5. カボチャにおける貯蔵性に関する選抜指標の探索

カボチャは冬春季に国内産の供給量が極めて少なくなるため、貯蔵性が高い品種の育成が求められている。そこで、カボチャ果実において、代謝物を選抜指標として肉質劣化特性を定量的に評価することを試みた。貯蔵性の異なるカボチャ約20品種を同一圃場で栽培し、貯蔵開始時点の代謝成分と貯蔵性（肉質劣化）の関係を解析した（図3）。PLS分析を用いて、2011年～2012年の3カ年においてカボチャの肉質劣化を指標化した貯蔵性予測を行ったところ、全年次において有効な予測精度が得られた（ $R^2 > 0.86$ ）。また、変数重要度を用いた解析により、選抜指標候補となる代謝物としてフルクトース およびアラビノースが抽出された⁶⁾。これらの濃度を貯蔵開始時点において測定することにより、高精度な貯蔵性予測が可能になる。



図3 カボチャ試料採取の写真

6. 参考文献

- 1) Liseck, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L. and Fernie, A.R.: Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat. Protocols* **1** 387-96 (2006)
- 2) Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A.K. and Fukusaki, E.: Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* **56** 744-50 (2008)

- 3)Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M. and Takebe, M.: Differences in the Metabolite Profiles of Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaf in Different Concentrations of Nitrate in the Culture Solution. *Plant Cell Physiol.* **49** 170-177 (2008)
- 4)Okazaki, K., Oka, N., Shinano, T., Osaki, M. and Takebe, M.: Metabolite profiling of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves by altering the ratio of NH_4^+ NO_3^- in the culture solution. *Soil Sci. Plant Nutr.* **55** 496–504 (2009)
- 5)Okazaki, K., Shinano, T., Oka, N. and Takebe, M.: 2012. Metabolite profiling of Komatsuna (*Brassica rapa* L.) field-grown under different soil organic amendment and fertilisation regimes. *Soil Sci. Plant Nutr.* **58** 696-706 (2012)
- 6)Okazaki, K., Kimura, Y., Sugiyama, K., Kami, D., Nakamura, T. and Oka, N.: Discovering metabolic indices for early detection of squash (*Cucurbita maxima*) storage quality using GC–MS-based metabolite profiling. *Food Chem.* **196** 1150-1155 (2016)