

窒素栄養が代謝プロファイルに与える影響の解析

岡崎 圭毅*・建部 雅子・中村 卓司・信濃 卓郎

はじめに

窒素栄養と作物成分 窒素栄養は植物の成分組成に影響を与える主要な環境因子として知られており、作物品質と密接に関わっていることが知られている。ハウレンソウではシュウ酸、硝酸、糖、抗酸化物質に対する影響について報告がなされている^{1,2)}。シュウ酸は有害物質とみなされており、人体においてミネラルの吸収を阻害することが報告されている³⁾。硝酸については、現在となつては意見が分かれているが、メトヘモグロビン血症や発ガンを引き起こす有害物質として認識され、低減化を目指した研究が行われてきた^{1,2,4)}。糖については、余剰な窒素施肥が含有率の低下につながることを報告されている¹⁾。著者らは、ハウレンソウにおいて窒素施用量を抑えることにより硝酸含有率が低減化し、硝酸含有率は糖含有率と負の相関関係にあることを報告している⁵⁾。

一方、植物の代謝制御に目を向けると、窒素栄養に対しては転写因子から酵素活性調節に至るまで複雑かつ堅固な制御機構を備えており、窒素供給量に従順な応答を示すことが知られている。Wangら⁶⁾によるシロイヌナズナのトランスクリプトーム解析では無機態窒素の硝酸を与えてわずか20分で地上部の183遺伝子、根部の1176遺伝子の発現が増加もしくは減少しており、硝酸還元、トレハロース代謝、リンゴ酸脱水素酵素、ニコチアミン合成などがこれに関与していることを示した。また、Scheibleら⁷⁾は硝酸の供与30分および3時間後に同様の解析を行って代謝マップ情報と統合させた。硝酸を与えた3時間後ではアミノ酸およびヌクレオチド代謝に関わる大部分の遺伝子の発現量が上昇したが、フェニルアラニン、リジン、トリプトファンなどのマイナーなアミノ酸合成に関わる発現量は減少した。また、トレハロース、フェニルプロパノイド、ホルモン代謝などにも短時間で発現量に影響が出ることが明らかにされた。このように、硝酸に対する植物の応答には迅速かつ広範囲の代謝系が関与しており、硝酸のシグナルが代謝産物の蓄積量にも大きな影響を与えていることが推察される。以上より、多くの作物成分は硝酸レベルすなわち体内窒素含有率の違いにより蓄積量が変動すると予想されたが、窒素栄養状態と作物成分の関係を欠乏ではない条件で包括的に調

査した事例は少ない。

そこで、GC-MSによるメタボリックプロファイリングにより、異なる窒素濃度で水耕栽培したハウレンソウにおいて基本的な一次代謝産物が窒素栄養状態とどのような関係にあるか調査した。

ハウレンソウにおける窒素栄養と代謝産物の関係

試験方法 ハウレンソウ（品種：サンピア，スパーダウン）を人工気象室で水耕栽培した。N濃度をNO₃⁻でそれぞれ1, 2, 4 mmol l⁻¹とした3段階の窒素処理を10日間行い収穫した。サンプリングはリーフパンチを用いて3~6葉から採取し、速やかに液体窒素で凍結させた。

抽出からGC-MS分析まではRoessnerら⁸⁾の方法に準拠した。試料は凍結乾燥させた後、マルチビーズショッカー（Yasui Kikai, Osaka）で粉碎し、メタノール・水・クロロホルムの混液で抽出した。抽出の際、内部標準としてリピトールを添加した。抽出液は乾固後、五酸化二リン入りの真空デシケーター内で水分を除去した。分析前処理として、オキシム化およびシリル化を行った。ガスクロマトグラフィーGC 6890（Agilent, Santa Clara, CA）にsplitlessで導入した。

GC分析にはRtx-5Sil MSおよびガードカラム（30 m, 0.25 μm film; Restek GmbH, Bad Homburg, Germany）を使用した。質量分析計はGCmate-II（二重収束磁場型, JEOL, Tokyo）を使用した。マススペクトルはm/zスキャンレンジ50-600, 毎秒2 scanで記録した。

代謝産物はNISTより無料で配布されているAMDIS⁹⁾により同定した。各化合物に由来するピーク面積値は、化合物ごとに適切な質量数（m/z）を選定し、シングルイオンクロマトグラムで算出した。得られた値は、内部標準であるリピトールの面積値で除した相対値に変換し、主成分分析などの多変量解析を行った。主成分分析にはSIMCA-P 11.0（Umetrics AB, Umeå, Sweden）を用いた。

GC-MSによる一斉分析の結果 ハウレンソウ葉身におけるGC-MS一斉分析により糖・有機酸・アミノ酸など51成分が検出された。窒素処理3段階2品種の計36個体から得られた51成分のピーク面積値を比較した。多くの化合物の面積値が全窒素含有率と正もしくは負の相関関係にあった。窒素含有率の高い個体において含有率

*著者紹介 北海道農業研究センター根圏域研究チーム（研究員） E-mail: okazakik@affrc.go.jp

表1. 作物体全窒素（N）含有率と相関を示す主な化合物

N との関係	化合物
N 増で 減少	スクロース, グルコース, キシロース, アラビノース, フルクトース, myo- イノシトール, L-トリプトファン, L-リジン
N 増で 増加	L-バリン, L-トレオニン, L-グルタミン酸, コハク酸, L-ホモセリン, L-アスパラギン酸, L-グルタミン, フマル酸, L-システイン, 4-ヒドロキシプロリン, L-セリン, <i>o</i> -クマル酸, L-イソロイシン, クエン酸, マロン酸, シュウ酸, <i>trans</i> -フェルラ酸, リンゴ酸

が低い化合物としてグルコース, フルクトース, スクロースなどの糖の他, リジン, トリプトファンなどがあげられた。一方, 窒素含有率の高い個体において高い含有率となるものはアミノ酸, TCA回路の有機酸, ケイ皮酸類であった(表1)。以上の分類結果を代謝マップと対応させたところ, 糖のプールが減少し, アミノ酸およびその中間代謝産物である有機酸類のプールが増加する大きな代謝の流れが見いだされた(図1)。

以上の結果から, ホウレンソウにおける代謝産物の窒素栄養への応答は, ホウレンソウの体内窒素濃度の上昇に伴い代謝産物が同調的に増減する。すなわち, 体内窒素含有率と代謝産物が正もしくは負の相関を示すような比較的識別・予測が容易な代謝応答であることが明らかになった。

メタボロミクスの可能性

メタボロミクスと品質評価 メタボロミクスは農産

物の判別あるいは品質評価の際に大変有効なツールとなる可能性を持っている。これまでの農産物の品質は, 成分面では糖・有機酸・アミノ酸・タンパク質・抗酸化物質といった代表的な数種類の代謝産物によって判断されてきた。しかし, 異なる品種と栽培環境(産地, 栽培方法など)の複雑な因子が組み合わせられた場合, 限られた代謝産物の情報だけで品質の差異を捉えることは難しい。メタボロミクス手法を用いて代謝産物全体を解析することにより, さまざまな因子との相互関係を詳細に捉えることができ, それぞれの事例においてよりの確な判別・評価手法を導入することができる。

たとえば甘みに関わる成分を例に挙げると, 通常はグルコース・フルクトース・スクロースの合計量やBrix値などの糖の総量を反映する値が評価に用いられるが, 実際には各成分の比率や上記の3糖以外の成分も甘みに関係していることは言うまでもない。Brixを用いた甘み評価は市場に存在している農産物の中で, 極端に甘み得点が低いものと高いものを評価するには問題ない。しかし, 品種Aと品種Bあるいは産地Cと産地Dの間の微妙な甘みの違いをBrixだけで評価できない場合は, 個々の甘み成分全体を比較し, AとBの間あるいはCとDの間で変動する甘み成分を選別し, 新しい評価軸を追加する必要がある。

さらに, メタボロミクス手法には代謝面からの情報が得られる有利性がある。植物は, 多様な環境に対してそのつど自らの代謝を変化させながら対応しているため, 代謝産物組成はそれまでの植物が経た環境変化に対する応答の履歴が反映されている。この環境要因と代謝産物の関係についてのデータを蓄積していけば, 作物と栽培

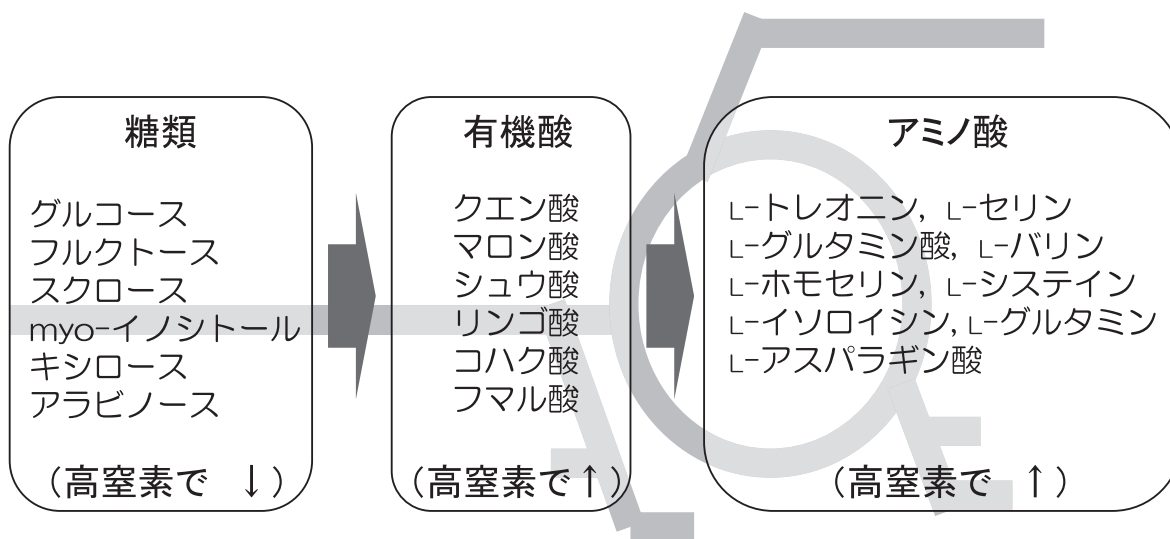


図1. 高窒素条件における代謝の流れ

環境の間の関係を、代謝を通したより深いレベルで捉えることができ、品質成分の変動メカニズムの解明につながる可能性がある。

今後の課題 一斉分析によって得られるプロファイル情報により、品質特性に対して従来の手法よりも精密な判別が可能になるのは確実と言える。しかしながら、本来の意味で農産物の品質をプロファイリングするためには、前述に示したような窒素供給量などの単一要因と代謝産物の関連を示すデータを積み重ねていくことが重要と考えられる。農産物を扱ったメタボロミクス研究はまだ始まったばかりだが、多くの研究者がプロファイリングの情報を共有し相互のデータを比較できるような環境が整えられることが必要である。

また、作物成分の蓄積機構に目を向けた場合、合成器官と蓄積器官など、器官の違いによりターゲットとなる代謝産物の動態が異なることが予想されるため、細胞を構成している各小器官別の情報がきわめて重要となる。著者らは、組織を CCl_4 -*n*-heptaneによる非極性溶媒中で酵素活性を阻害した状態で抽出し、その後各小器官を密度勾配遠心法を用いて分画する手法を開発している¹⁰⁾。この手法を用いてクロロプラスト、細胞質、液胞の3画分にダイズの葉を分画し、それぞれの画分中に含まれる成分に関してGC-MSによって一斉分析を行った。図2に見られるようにそれぞれの器官では構成される化合物に特徴的な傾向が認められる。今後、品質のプロファイリングを進める上でもこのような詳細な情報を組み合わせることで、より高精度の代謝解析が可能になることが期待される。

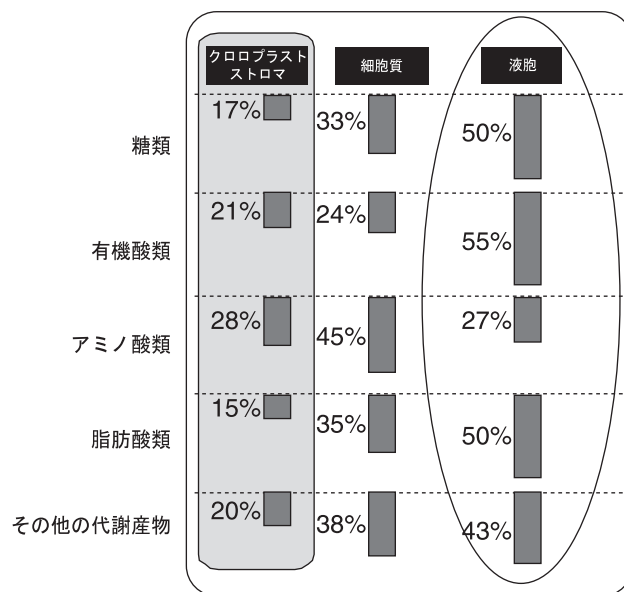


図2. GC-MS分析で測定した小器官別の代謝産物分配割合。(文献10, Benkeblia, *et al.*, 2007を改変). 各成分についてクロロプラスト・細胞質・液胞の中での分配割合を%で示した。

文 献

- 1) 建部雅子：農業研究センター報告, **31**, 19 (1999).
- 2) 目黒孝司ら：日本土壤肥科学会誌, **62**, 435 (1991).
- 3) Oke, O. L.: *World Rev. Nutr. Diet.*, **10**, 262 (1969).
- 4) Blom-Zandstra, M.: *Ann. Appl. Biol.*, **115**, 553 (1989).
- 5) 岡崎圭毅ら：日本土壤肥科学会誌, **77**, 25 (2006).
- 6) Wang, R. *et al.*: *Plant Physiol.*, **132**, 556 (2003).
- 7) Scheible, W. R. *et al.*: *Plant Physiol.*, **136**, 2483 (2004).
- 8) Roessner, *et al.*: *Plant J.*, **23**, 131 (2000).
- 9) <http://chemdata.nist.gov/mass-spc/amdis/>
- 10) Benkeblia, N. *et al.*: *Metabolomics*, **3**, 297 (2007).