

学位論文題名

Metabolites profiling concerning nitrogen nutrition for improving crop quality of *Spinacia oleracea* L.

(メタボリックプロファイリングによるホウレンソウの
品質向上を目指した研究)

学位論文内容の要旨

植物において糖・有機酸・アミノ酸などのいわゆる一次代謝産物は、光合成・糖代謝・TCA サイクル・炭素および窒素の同化とその後の一次代謝および二次代謝への分配に関係している。よって、一次代謝産物のプロファイル(組成)はこの一次代謝および二次代謝の代謝フローの活性を反映するものであると言える。従来は、一次代謝産物(糖・有機酸・アミノ酸)の化学的性質がそれぞれ異なるため、同時にこれらの産物の量的挙動を計測し評価することは難しい課題であった。しかしながら、近年、特に質量分析手法のめざましい発展により、糖・有機酸・アミノ酸を含めた多くの化合物の一斉分析が可能になった。このことは生物統計学、ケモメトリクス、バイオインフォマティクス分野の発展と相まってメタボロミクスやメタボリックプロファイリングといった新しい研究領域を形成するに至っている。本研究では、最新の分析手法を導入して、野菜の品質管理に関する新たな手法を開発し、学術研究の新たな領域を切り開いた。

窒素栄養は植物において最も重要な因子であり、体内成分組成に影響を与えるため作物品質と密接に関係していることが知られている。これまでに窒素栄養と品質の関係を扱った研究は多数報告されているが、糖類・有機酸類・アミノ酸類それぞれに限定した報告や、あるいは特定の化合物の挙動に着目した報告が大半であり、代謝応答の全体像を捉える事を目的とした研究は十分に行われていない。本研究では、窒素供給量及び NH_4/NO_3 比率がホウレンソウの一次代謝産物の組成に与える影響を包括的に解析するために、ガスクロマトグラフ質量分析計を利用したメタボリックプロファイリング手法を適用して糖・有機酸・アミノ酸を一斉分析し、以下の新規の知見を得た。

①窒素供与量がホウレンソウの代謝産物組成に与える影響の解析：ホウレンソウにおける窒素供与量と代謝産物組成の関係は窒素供与量の増加に伴いアミノ酸含有率が増加することなどが報告されているが、糖・有機酸・アミノ酸を網羅した包括的視点からの研究はほとんど行われていない。本研究では水耕栽培において収穫8日前より3段階の NO_3 濃度処理を設けてホウレンソウを2品種栽培した。栽培初期に 4mmol N L^{-1} で栽培し、収穫前に窒素供与量を低下させる処理($1, 2, 4\text{mmol N L}^{-1}$)を設け、全窒素および NO_3 含

有率が有意に異なる試料を得た。生育量は品種スペードワンでは有意な差が無かったが、サンピアでは窒素供与量の低下に伴い減少した。成熟葉から代謝産物を液体抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計により糖・有機酸・アミノ酸の一斉分析を行い、約50代謝産物を同時に検出した。各試料の代謝産物データを用いて主成分分析を行ったところ、全分散の44.5%が第1主成分によって説明され、これは窒素供与量に対応しており品種の違いの影響は小さかったことから、窒素供与量が代謝産物組成に大きく影響することを示唆した。さらに、各代謝産物の挙動を明らかにするため、自己組織化マッピング法によりクラスタリングを行って各代謝産物グループの挙動を調査したところ、窒素供与量と直線的に正の相関および負の相関を示す2つのグループに多くの代謝物が属し、窒素供与量に対する代謝産物の応答は単純かつ一体的であることが明らかになった。これらの代謝産物の変動と代謝マップと対応させたところ窒素供与量の増加に伴い糖類が減少、有機酸およびアミノ酸類が増加する傾向が明確に現れ、糖代謝から窒素代謝へ炭素分配がシフトし、NO₃ 供与量の増大により窒素の同化およびその後の代謝フローが促進されることが示された。また、トリプトファンやリジンなどは他のアミノ酸の挙動に反して窒素供与量の増加に伴って低下し、ハウレンソウに特異的な代謝変動を観測することができた。

②NH₄/NO₃ 比率がハウレンソウの代謝産物組成に与える影響の解析：ハウレンソウにおけるNH₄/NO₃ 比率と代謝産物組成の研究はこれまで多くの報告があるが、有機酸・アミノ酸・アミドなど一部あるいは特定の代謝物を扱ったものが多く、包括的視点からの研究はほとんど行われていない。本研究では、窒素供与量の試験と同様の方法でNH₄/NO₃ 比率を変えた処理を設けてハウレンソウ2品種を栽培した。処理はNO₃:NH₄ 比率を10:0から収穫の8日前において10:0, 5:5, 3:7に変更した処理区を設定した。主成分分析により第1主成分（全分散の50.3%を説明）が溶液のNH₄/NO₃ 比率に対応し、第2主成分（全分散の12.4%を説明）が品種に対応し、NH₄/NO₃ 比率もまた代謝産物組成へ大きく影響することを示唆した。また、各代謝産物の挙動は窒素供与量との場合と同様2つのグループに収束し、応答が単純かつ一体的であることが示された。代謝マップと対応させたところ、NH₄/NO₃ 比の増加に伴い有機酸が減少、アミノ酸が増加し、窒素供与量による影響とはまったく異なっており、メタボリックプロファイリングによりこれらの影響を容易に区別することが可能であることが示された。

以上により、ハウレンソウにおける糖・有機酸・アミノ酸組成に対する窒素供与量及びNH₄/NO₃ 比率の影響を包括的な視点から解析し、特徴的な代謝産物の挙動を明らかにした。これらの知見により窒素供与量及びNH₄/NO₃ 比率の変更を組み合わせることにより、糖・有機酸・アミノ酸組成を制御することが可能であり、養液栽培等を行っている葉菜類の品質制御の要素技術として直接利用可能である。さらに、本研究により供給されるNH₄/NO₃ 比率に対応した特徴的な代謝変動が明らかになった。これを応用すれば葉身の代謝産物より窒素吸収形態を定量的に見積もることが可能になると考えられる。窒素吸収形態の他、様々な環境要因に対応した特徴的な代謝産物の挙動を今後明らかにすることにより、他の要因についても定量的な評価が可能になるものと考えられる。

本研究の成果は、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いたメタボリックプロファイリング手法、およびハウレンソウなどの実用作物を扱った品質評価研究に適用させるための方法論を確立させ、窒素供与量および NH_4/NO_3 比の影響を可視化したことにある。得られた知見は今後の品質評価および環境からの影響解析の研究において幅広く利用されることが期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 崎 満
副 査 教 授 松 井 博 和
副 査 教 授 波 多 野 隆 介
副 査 助 教 渡 部 敏 裕

学 位 論 文 題 名

Metabolites profiling concerning nitrogen nutrition for improving crop quality of *Spinacia oleracea* L.

(メタボリックプロファイリングによるホウレンソウの
品質向上を目指した研究)

本論文は59頁、参考文献70報、図8、表4から構成された英語論文で、他に参考論文が8報付属している。本論文の目的は、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた糖・有機酸・アミノ酸によるプロファイリング手法（組成分析）を確立し、窒素栄養条件の違いが作物品質に与える影響を包括的な視点から明らかにすることにある。

植物において糖・有機酸・アミノ酸などのいわゆる一次代謝産物は、光合成・糖代謝・TCA サイクル・炭素同化・窒素同化と密接に関連するのみならず、その後の代謝フローの活性を強く反映するものであると言える。従来は、一次代謝産物の化学的性質がそれぞれ異なるため、同時にこれらの産物の量的挙動を計測し評価することは困難であった。しかし、近年、特に質量分析手法のめざましい発展により、植物の代謝産物をガスクロマトグラフ質量分析計で一斉分析することが可能となった。そこで、最新のメタボリックプロファイリング分析手法を導入して新たな植物代謝解析手法を確立した。この手法により環境因子が植物代謝に及ぼす総合的影響の解明が可能となり、品質等の新たな評価手法として利用できることを明らかにした。特に、窒素栄養は植物において最も重要な環境因子であり、体内成分組成に影響を与えるため作物品質と密接に関係していることが知られているが、代謝応答の全体像を捉える事を目的とした研究は十分に行われていない。そこで、窒素栄養が植物代謝に及ぼす総合的影

響をメタボリックプロファイリング分析手法で解明し、以下の成果を得ることが出来た。

①窒素供与量がホウレンソウ代謝産物に与える影響の解析

水耕栽培において3段階の NO_3^- 濃度処理を設けて窒素利用効率の異なるホウレンソウを2品種栽培した。精密な養分供給制御により、ホウレンソウに黄化などの障害を起こさせることなく、植物体内の全窒素および NO_3^- 含有率が有意に異なる試料を得た。成熟葉から代謝産物を抽出し、ガスクロマトグラフ質量分析計により糖・有機酸・アミノ酸などの一斉分析を行い、約50代謝産物を同時に検出した。各試料の代謝産物データを用いて主成分分析を行ったところ、全分散の44.5%が第1主成分によって説明され、この第1主成分は窒素供与量に対応し、品種の違いの影響は小さかった。さらに、各代謝産物の挙動を明らかにするため、自己組織化マッピング法によりクラスタリングを行い各代謝産物グループの挙動を調査したところ、窒素供与量と正の相関および負の相関を示す2つのグループに多くの代謝物が属し、窒素供与量に対する代謝産物の応答の大部分は単純かつ一体的であることが明らかになった。これらの代謝産物の変動と代謝マップと対応させたところ窒素供与量の増加に伴い糖類が減少し、有機酸およびアミノ酸類が増加する傾向が明確に現れ、窒素供与量の増大により窒素の同化およびその後の代謝フローが促進されることが示された。

② $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比率がホウレンソウの代謝産物組成に与える影響の解析

同様の栽培法で $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比率を変えた処理を設けてホウレンソウ2品種を栽培した。代謝産物データの主成分分析により第1主成分（全分散の50.3%を説明）が溶液の $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比率に対応し、第2主成分（全分散の12.4%を説明）が品種に対応した。また、大部分の代謝産物の挙動は窒素供与量との場合と同様に単純かつ一体的であることが示された。代謝マップと対応させたところ、 $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ 比の増加に伴い有機酸が減少し、アミノ酸が増加し、窒素供与量による影響とは全く異なるプロファイルが得られた。

以上、本研究により、植物代謝の包括的理解を可能にする最新のメタボリックプロファイリング手法を確立し、および、それを利用した品質評価法の確立がなされた。得られた知見は今後の植物生理の総合的研究および環境からの影響をうける品質の評価研究において幅広く利用されることが期待される。

よって、審査員一同は、岡崎圭毅が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。