

マルチオミクス解析による 農業生態系のデジタル化

理化学研究所
バイオリソース研究センター
市橋 泰範
福島大学食農学類
二瓶 直登

はじめに

1840年にリービッヒが「植物は無機物で栄養を吸収する」という「無機栄養説」を提唱してから、ノーベル化学賞を受賞したハーバー・ボッシュの化学的窒素固定の確立を経て、窒素化学肥料が開発された。1960年から2000年にかけて世界の農地面積はほぼ一定であったにもかかわらず、世界人口は倍増した。その間に窒素化学肥料の使用量は8倍になっていることから、窒素化学肥料の開発は、人口増加や食料増産に大きく寄与したとされる。一方で、農地への過剰な施肥により、農業由来窒素が引き起こす環境汚染や土壌の劣化など、大量生産・大量消費・大量廃棄型社会の弊害が表出している。

このような背景のもと、2021年に農林水産省からみどりの食料システム戦略として2050年までに化学肥料使用量の30%低減、化学農薬使用量（リスク換算）の50%低減、耕地面積に占める有機農業の取組面積の割合を25%拡大、農林水産業のCO₂ゼロエミッション化などの目標が掲げられ、2022年に環境と調和のとれた食料システムの確立のための環境負荷低減事業活動の促進等に関する法律「みどりの食料システム法」が成立した。この目標を達成するには、多様な土壌や気候条件の日本において単一の品種や栽培法に頼ることは難しく、多様な栽培環境に適用した農業のオーダーメイド

化が必須である。また近年の激しい気候変動には年単位の時間がかかる育種技術のみでは対応しきれないため、栽培管理により迅速かつ柔軟に対応できる農業をいかに実現するかが肝要であると考えられる。

しかしながら、農業を取り巻く環境は極めて複雑である(Toju *et al.* 2018)。例えば土壌微生物は、植物残渣や堆肥等を分解し植物が利用可能な形態に変化させるなど作物の生産には欠かせない役割を担うが、作物生育を阻害する病原菌もあり、微生物叢のバランスが重要である。このように農業生態系は植物-微生物-土壌の各階層が複雑に関係し合うシステムとして形成され、これまでの個別の研究分野のみでは農業生態系の実態を部分的にしか解明できなかった。そこで本稿では、最先端技術であるマルチオミクス解析を農業生態系に適用することで、植物科学、微生物学、土壌学などの研究分野を横断する網羅的なデータを取得して、分野を超えた新しい知見を見出した研究事例を紹介する(Ichihashi *et al.* 2020)。加えて、このような農業生態系をデジタル化した先にある新しい農業について論じる。

マルチオミクス解析とは

農業現場における植物-微生物-土壌の各階層の構成要素を網羅的に解析する技術の一つにオミクス解析がある。オミクス解析には、微生物叢を対象としたマイクロバイーム解析、発

現遺伝子を対象としたトランスクリプトーム解析、代謝物を対象としたメタボローム解析などがあり、解析対象に応じて異なる分析技術や計測機器が用いられている。例えば、マイクロバイーム解析やトランスクリプトーム解析では、ここ10年ほどで急速に普及した次世代シーケンサーが一般的に利用されており、シーケンシング技術の進歩に伴い短時間で大量の塩基配列を解読することができる。このため、マイクロバイーム解析では微生物叢の種類や存在量を、トランスクリプトーム解析では発現している遺伝子群の情報をビッグデータとして取得することができ、包括的に評価することが可能になった。一方、メタボローム解析では、質量分析(MS)装置や核磁気共鳴(NMR)装置などが利用されており、生体内に含まれる低分子化合物を定性的および定量的に評価することができる。しかし、試料中に含まれる全ての代謝物を単一の分析装置のみで網羅的に検出することは今のところ不可能であるため、複数の計測機器を相補的に組み合わせて網羅性を担保する必要がある。また、検出可能な代謝物の種類やそのダイナミックレンジは計測機器ごとに大きく異なっており、一例として、GC-MSは有機酸や芳香族化合物などの揮発性有機物、LC-MSは脂質代謝物や二次代謝物、NMRは比較的存在量の多い一次代謝物の評価に適している。

農業現場では、微生物や発現遺伝子、代謝物などの各構成要素が複雑に

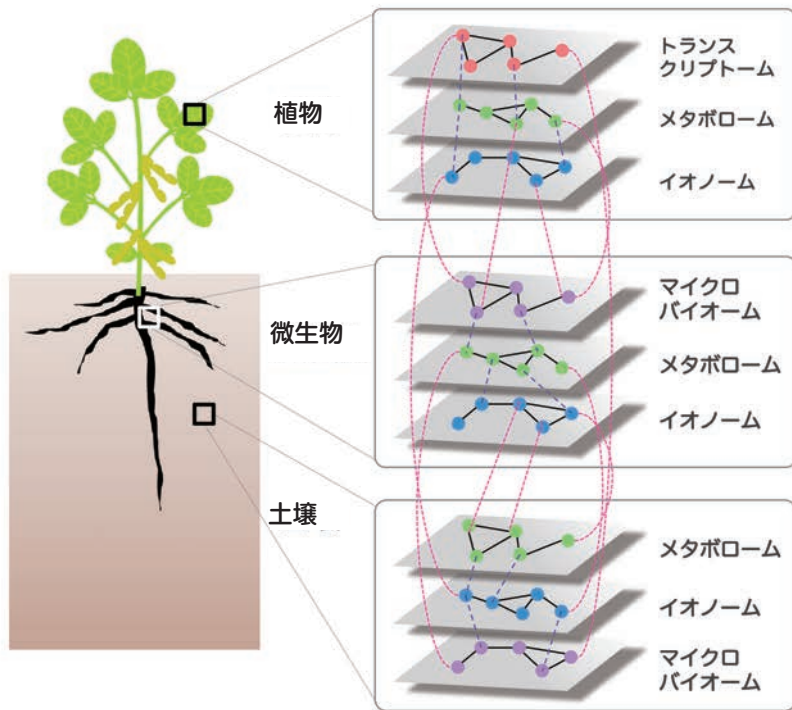


図-1 農業生態系のマルチオミクス解析

農業現場では、植物、微生物、土壌における代謝物や元素等の各要素が複雑に絡み合い、極めて複雑な農業生態系を形成している。マイクロバイオーム解析やメタボローム解析などの個別のオミクス技術を統合したマルチオミクス解析は農業生態系の全容を解き明かす解析技術である。(市橋ら 2020 より改変)

絡み合い、極めて複雑な農業生態系を形成している。この複雑な生態系の全容を解き明かすためには、複数のオミクス解析によって得られた情報や各構成要素同士の相互関係などを統合的に解析する必要がある。このような解析アプローチは「マルチオミクス解析」と呼称されており、当初医学分野で導入が進んだが、農業生態系内で生じている現象を包括的に調べることに適用が可能である(図-1, 市橋ら 2020)。このマルチオミクス解析では植物-微生物-土壌の各階層のデータを有機的に紐づけることが極めて重要である。そのため、同じ試験区、個体、組織からサンプリングすること、異なる分析機器での解析でも共通な前処理の工程まで同一サンプルとして扱うことがデータの質を決定する。またビッグデータ解析技術の発展により、個別のオミクス解析によって得られた膨大なデータについて統合インフォマティ

クス解析が可能となった。複数のオミクスデータを統合する際のフォーマットの統一やマニュアルでデータ結合することで生じるエラー等はビッグデータ解析における大きな問題の一つであり、特にマルチオミクス解析特有の問題として、個別のオミクスデータが連続変数、離散変数、カテゴリ変数の違いがあり、それぞれに最適な正規化やフィルタリングについて工夫が必要である。またマルチオミクスデータから科学的知見を見出すため、関連ネットワーク解析が利用されている。ネットワークとは、ノードの集合とエッジの集合で構成されるグラフのことであり、マルチオミクスデータによる関連ネットワークでは、ノードが測定項目となり、エッジが測定項目間の相関関係を示す。またネットワーク上でノードが密につながった集合をモジュールとして検出することができ、他のノードと多くエッジを形成しているノード

をハブノードとして検出することができる。このような関連ネットワーク解析により、農業生態系の全容を可視化することができ、ネットワーク構造の理解や特徴的なエッジの探索から農業生態系における植物-微生物-土壌の関係性を抽出できる。しかし、ここで得られる知見はあくまで相関関係であり、因果関係ではない。統計的因果推論の各手法を適用することで、マルチオミクスの統合データ行列からの因果関係の検出が有効であり、その検証については現在取り組んでいる。

有機農法・太陽熱処理について

ここでは我々が行ったマルチオミクス解析を用いた土壌の太陽熱処理についての研究を紹介する(Ichihashi *et al.* 2020)。太陽熱処理とは、耕起した畑をビニールマルチで数十日間覆うことで、土壌中の病害虫や雑草種子を死滅させ、農薬を使わずに土壌環境を維持できる手法として知られている。また太陽熱処理を実施した圃場では、滅菌や雑草防除とともに、作物の生育促進効果が認められる。このような生育促進効果は土質や栽培品目によらず確認されており(Chen *et al.* 1980 など)、有機農法の優れた技術の一つとされる。しかしながら、太陽熱処理による生育促進効果の要因については諸説あり、低分子~高分子の土壌成分や微量元素の変化、希少病原菌の除去、作物生育調整因子の分泌や有益な微生物

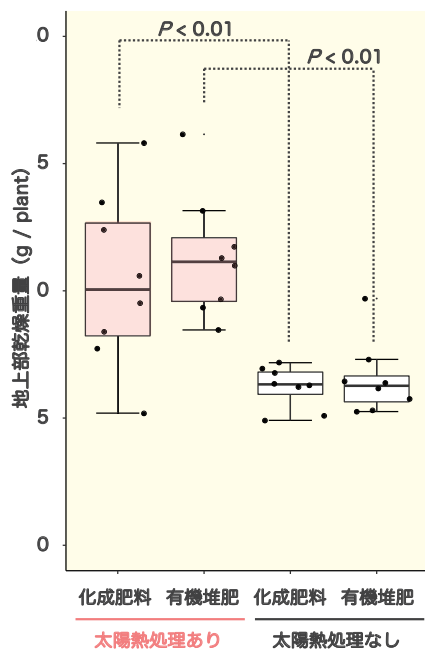


図-2 太陽熱処理による植物生育促進効果
 コマツナ収量の指標となる地上部乾燥重量を示す。その結果、太陽熱処理はコマツナの地上部乾燥重量を有意に向上させた。有意差検定を Tukey's post hoc test にて実施した。(Ichihashi *et al.* 2020 より改変)

物の活性化など様々な要因が想定されているが、主要な因子については未解明であった。

私たちは、千葉県八街市の篤農家（経験に基づく優れた生産技術を持つ農家）の協力を得て試験を行った。ここでは太陽熱処理が実施されており、収量・品質ともに非常に優秀な作物が毎年生産されている。そこで、同じ圃場内において異なる農法、すなわち化学肥料もしくは堆肥を施肥して太陽熱処理有無の4種類の試験区を設置し、それぞれの試験区においてコマツナを栽培した。その結果、太陽熱処理（本試験では5週間実施し、日積算土壌温度は1,000°C以上）は、土壌設置の電位センサーから土壌物理環境を大きく変化させることが分かり、化学肥料、堆肥によらず、コマツナの収量をおよそ1.7倍に増加させた（図-2）。一方で、コマツナの他の形質（植物地上部の全代謝物、葉の形、光合成活性、糖度、酸度、葉の色素、病害、食味）に

有意な違いは検出されなかったことから、太陽熱処理は慣行農法と同等の品質を維持した上で、コマツナの収量を増加させることが分かった。また、翌年も太陽熱処理による成長促進効果が確認された。

太陽熱処理における土壌代謝物、元素、細菌叢の変化

そこで太陽熱処理によって農業生態系を構成する植物-微生物-土壌がどのように変化するかを捉えるために、作付け前および収穫時の土壌についてNMR法による代謝物質のプロファイリングを行った。検出された代謝物データを用いて主成分分析を行った結果、試験区間で明確な違いが検出されたことから、物理的に離れた場所に設置した試験区であっても、4種類の異なる処理による土壌特性をそれぞれ反映していることが分かった（図-3a）。しかし、アンモニア態および硝酸態窒素である無機態窒素の濃度は、太陽熱処理の有無で有意な違いは検出されなかったため、有機態窒素から無機態窒素の分解が平衡状態を維持しながら植物の窒素吸収率が増加した、もしくは無機態窒素が作物の主要な窒素源とするリービッヒの無機栄養説では説明できない現象であると考えられた。また土壌C/N比において試験区間で差が検出されなかったため、太陽熱処理が有機態窒素の分解過程の全体に影響しているということも考えづらく、これまでの植物栄養学の知見からは理解し

づらい現象が生じていた。

続いて、次世代シーケンサーを用いて土壌および根圏における細菌叢を解析したところ、太陽熱処理は土壌全体の細菌でなく、作物の根圏に生息する細菌の種類に大きく影響を与えていることが分かった（図-3b）。そこでは門レベルでの大きな影響が確認され、デイノコックス・テルムス門やフィルミクテス門が太陽熱処理をした根圏で多くなること、特に植物の成長促進に関与する根圏細菌としてパエニバシラス属とシュードモナス属が太陽熱処理により多くなることが分かった。実際、これらの細菌種は太陽熱処理後の土壌で栽培した作物の根から単離された事例もある（Tjamos *et al.* 2004）。これら細菌について機能的な側面の解析が待たれるが、以上の結果から、自然の物質循環である有機物と根圏細菌叢の相互作用が、太陽熱処理による成長促進効果に関与していることが示唆された。

マルチオミクス解析により太陽熱処理における主要因子として有機態窒素を同定

そこで、太陽熱処理に呼応する植物-微生物-土壌の複雑なネットワークについて、その「ありのままの姿」をデジタル化するために、全てのデータを統合した相関ネットワーク解析を行った。具体的には作物収量に加え、糖度、酸度、硝酸濃度、SPAD値、タンパク質含量、イオン組成、および

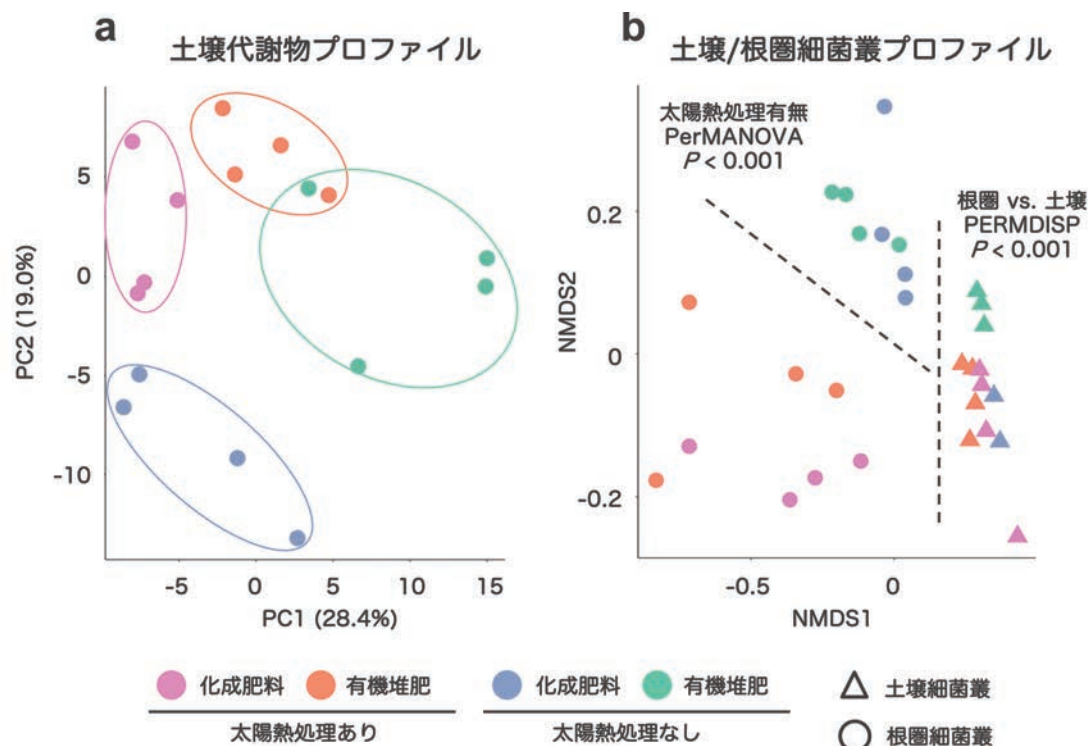


図-3 太陽熱処理における土壤代謝物、元素、細菌叢の変化

(a) 土壤中の代謝物と元素プロファイルを主成分分析により解析。試験区間で異なる違いが検出された（各試験区サンプル群を丸で囲んで示す）。(b) 土壤及び根圏細菌叢プロファイルにβ多様性のBray-Curtis非類似度の距離行列を使ってNMDSで描写。有意差検定をPerMANOVAおよびPERMDISPにて実施した。（Ichihashi *et al.* 2020より改変）

一次代謝物、土壤においてはpH、C/N、イオン組成の他、主要な代謝物のメタボローム解析、非根圏および根圏土壤に存在する全細菌のマイクロバイオーム解析から合計395測定項目を対象とした。その結果、農業生態系は作物が示す特定の形質、すなわち収量や品質等と特定の微生物種や土壤成分で構成されたモジュールが複数組み合わせられたネットワークを形成していることを世界で初めて明らかにした（図-4）。このような構造は、他の生物学的な現象によく観察されるネットワークと類似の構造であり、また農業生態系における植物-微生物-土壤の異なる階層が、幾十にも複雑に相互作用していることを反映している。さらに明らかにしたネットワークの情報から、作物の収量を含むモジュールにアミノ酸などの有機態窒素や根圏細菌が含まれており、特に土壤中の有機態窒素がハブノードとして検出された。このこ

とから、太陽熱処理により植物根圏に特徴的な細菌叢が形成され、土壤中に蓄積する有機態窒素が作物の生育促進に関与していることが判明した。

次に、ネットワーク解析から導出された有機態窒素を対象にコマツナの無菌培養系により添加実験を行った結果、アミノ酸のアラニンと栄養素のコリンが、栄養源や生理活性物質として収量を増加させることが明らかになった（図-5）。またコリンによりコマツナの根のバイオマスが増加することが確認され、先行研究においてアラニンの前処理により植物のアラニン吸収が活性化されることも知られているため（Nihei *et al.* 2008）、これらの有機態窒素が植物に対して窒素源の獲得能力を向上させているかもしれない。特にアラニンは栄養源と生理活性物質の両方として振る舞うため、実際にどのように植物に吸収され代謝されているかを、炭素と窒素の両方を安定同位体で

標識したアラニンを使うことで調べた。その結果、コマツナが直接アラニンを吸収していることが分かり、さらに吸収されたアラニンが、コハク酸、グルタミン、プロリンと代謝されることを明らかにした。このことは、植物がアミノ酸を栄養源として直接吸収することで、体内で無機態窒素からアミノ酸を合成する代謝エネルギーを節約できることを示唆する。

さらに、アラニンを土壤に添加して試験を行った結果、無機態窒素と同等の収量増加が確認され、栽培期間中に土壤のアラニン濃度が低下するとともに、無機態窒素濃度が上昇することも分かった。このことは、アラニンは土壤の中で植物に直接吸収されるとともに、無機態窒素へ分解されることを示している。以上より、太陽熱処理により蓄積された有機態窒素は、直接および間接的に栄養源として植物に利用されながら、生理活性物質としても機能

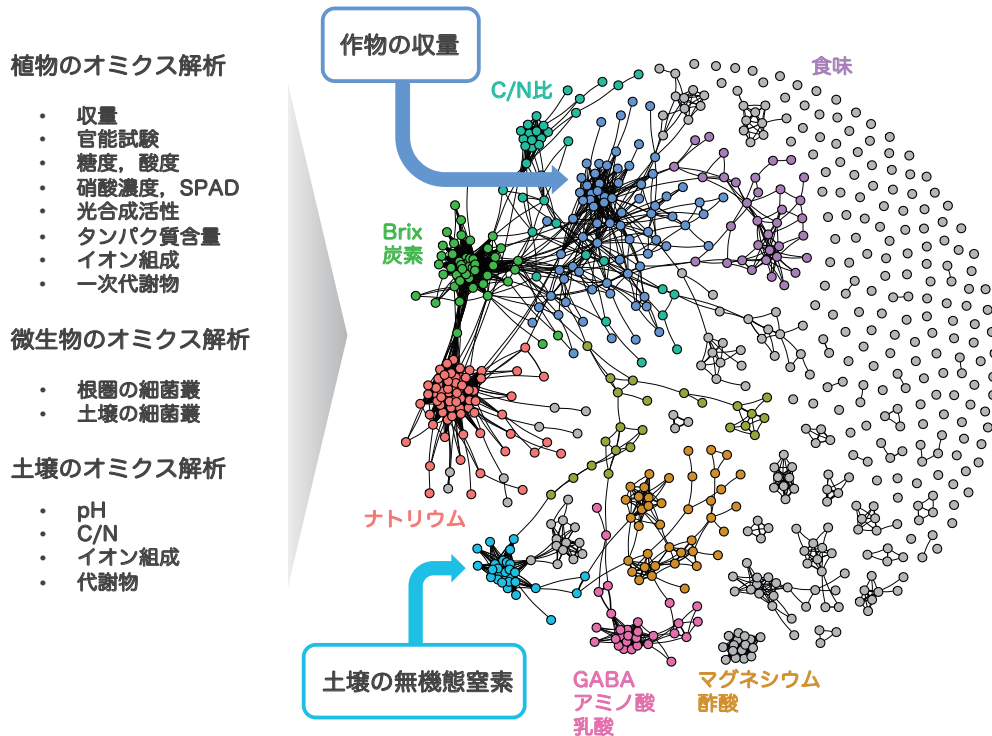


図-4 マルチオミクス解析により明らかになった農業生態系ネットワーク

取得した全データを統合したデータ行列を用いて相関ネットワーク解析を行うことにより、農業生態系をデジタル化することに成功した。その結果、農業生態系は作物の形質と特定の細菌種や土壌成分で構成されたモジュールが複数組み合わせられて織りなされるネットワークを形成していることが分かった。特に、作物の収量を含むモジュールは土壌中の無機態窒素を含むモジュールとは異なることが分かった。(Ichihashi *et al.* 2020 より改変)

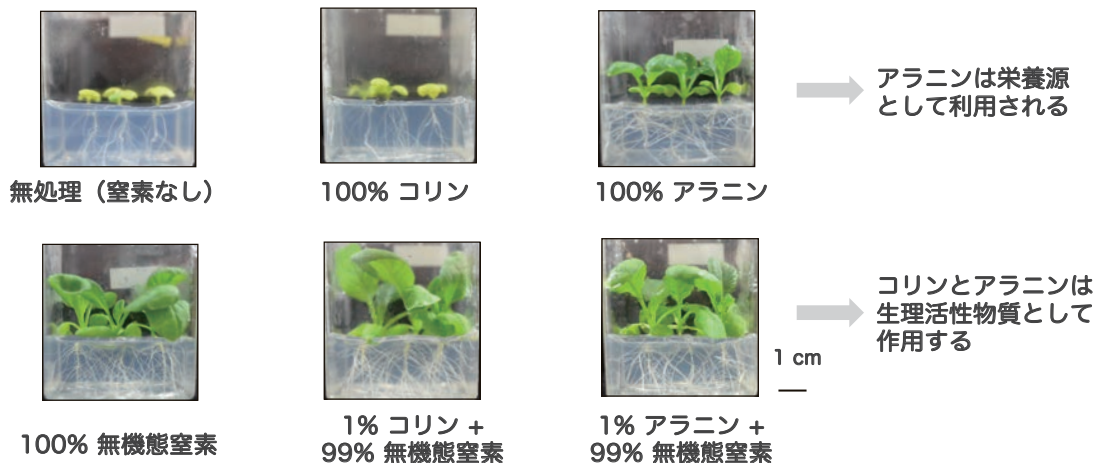


図-5 有機態窒素の植物生育に及ぼす影響

ネットワーク解析から見出した有機態窒素の植物への影響について、コマツナの無菌栽培の実験系により解析した。その結果、アラニンが栄養源として、コリンとアラニンが生理活性物質として作物の生育に作用することが分かった。(Ichihashi *et al.* 2020 より改変)

するという複雑な作用機序を示すことが明らかになった。本研究から、有限な鉱物資源を原料とした化学肥料に頼らず、有機態窒素を活用することで持続可能な作物生産が可能であることが示唆された。

このような学問分野を横断したマルチオミクスデータを統合して、農業生

態系ネットワークが示すモジュール構造に基づいて作物の生育に関与する土壌因子を同定することにより、学術的なバイアスが少なくデータドリブンで現象の本質にたどり着くことができた。特に今回明らかにしたアラニンやコリンはペアワイズの比較解析では検出できず、またメタボロームデータ

のみの判別分析からでも作物収量との関係性を見出すことができなかったため、マルチオミクスデータを用いた相関ネットワーク解析は植物-微生物-土壌の関係性を抽出する上で非常に有効な手法であることがわかる。

農業生態系をエンジニアリングする

上記の研究から、農業現場にマルチオミクス解析を用いることで複雑な農業生態系を研究対象として十分扱えることがわかったため、私たちは試験規模および分析対象を拡大した研究プロジェクトを全国圃場で複数の作物種へと展開している。これまでの測定項目に加え、作物の二次代謝物、脂質代謝物、硫黄代謝物および全遺伝子発現、土壌の二次代謝物および揮発性成分、土壌物理性として土壌硬度、C/N、透水性、保水性、粒径分析等、10,000以上の測定項目のマルチオミクスデータを取得しており、農業生態系の植物-微生物-土壌の複雑なネットワークについて、その「ありのままの姿」のデジタル化を進めている。マルチオミクス解析による農業生態系のデジタル化は、篤農家の匠の技として伝承されていた有用な作物生産技術等を科学的に形式知化する新しい手法であり、今後の農学分野における解析アプローチの主流となるであろう。加えて本研究の結果は、従来の研究ではその複雑さゆえに十分に解析されていなかった農業生態系を理解することで、適地適作を工業的センスで推進する「農業環境エンジニアリング」への道が切り拓か

れるものと期待される。

また農業生態系のデジタル化を利用することで、サイバー空間で農業を完全シミュレーションするシステムを開発できると私たちは考えている。具体的には、収穫時期までの気象予測とその土地の土壌データを入力して、作物の収量や品質さらに環境負荷の程度を自由に選択すれば、その実現に最適な栽培管理法を出力させることができる作付けの意思決定を支援するシステムを想定している。このシステムを開発するために気象-土壌環境-作物生育の統合物理構成モデルを構築し、取得するマルチオミクスデータを機械学習等の帰納的な手法により組み込むことを予定している。これにより、従来の収量や生育といった基本パラメータ以外に、作物の機能性成分や保存性・耐病性等といった多角的な評価が可能となり、また土壌中の物理化学性に加えて、土壌生物性の評価を加えることでより高解像度なモデルへと拡張できる。乗り越えるべき技術的なハードルはまだ多くあるが、このシステムが完成すれば、それぞれの土地で安定した収量・品質の作物をオーダーメイド生産することができ、高収益化とともにカーボンニュートラルを実現する完全資源循環の栽培といった、今後人類が直面する数多くの課題に対応した農業が実現する未来が訪れるだろう。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、内閣府 戦略的イノベーション創造プログラム (S I P) 「スマートバイオ産業・農業基盤技術」(管理法人: 生研支援センター) および内閣府ムーンショット型農林水産研究開発事業(管理法人: 生研支援センター) によって実施されました。

参考文献

- Chen, Y. *et al.* 1980. Effect of solar heating of soils by transparent polyethylene mulching on their chemical properties. *Soil Sci.* 130, 271-277.
- Ichihashi, Y. *et al.* 2020. Multi-omics analysis on an agroecosystem reveals the significant role of organic nitrogen to increase agricultural crop yield. *PNAS* 117, 14552-14560.
- 市橋泰範ら 2020. マルチオミクス解析で拓く次世代農業. *アグリバイオ* 8月号, 18-22.
- Nihei, N. *et al.* 2008. Imaging analysis of direct alanine uptake by rice seedlings. *Radioisotopes* 57, 361-366.
- Tjamos, E.C. *et al.* 2004. Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahlia* of solanaceous hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 110, 35-44.
- Toju, H. *et al.* 2018. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat. Plants* 4, 247-257.