

自動植物フェノタイピングシステム"RIPPS"の開発と植物環境応答解析

藤田 美紀, 篠崎 一雄

理化学研究所 環境資源科学研究センター 機能開発研究グループ

〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

Miki Fujita, Kazuo Shinozaki

Development of "RIPPS", an automated phenotyping system for evaluation of environmental stress Response

Key words: environmental stress, imaging, in-house plant phenotyping system

RIKEN Center for Sustainable Resource Science,

3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0074, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b3.00156

1. はじめに

近年のシークエンス技術の高度化により、ゲノム情報の解析スピードと精度は大幅に向上し、モデル植物にとどまらず、様々な植物種の全ゲノム情報が入手可能となっている。これら大量の配列情報を用いて遺伝子の機能解明を進め、有用因子を見つけ出すためには、大量の遺伝子型に対応する形質情報が必要である。このためには、形質を数値化あるいは特性分類できる、ハイスループットで再現性の高い表現型解析（フェノタイピング）技術が重要となる。最近、急速に進化した画像解析技術により表現型解析の新展開が進んでいる。また、形質の発現は、遺伝子と環境の相互作用によって規定されることから、環境条件に関しても数値化による把握あるいは精密な制御による均一化を行う必要がある。

植物におけるフェノタイピングは、細胞や器官レベルから個体、群落など、様々なレベルで進められているが、本稿では、植物個体を対象としたハイスループット解析のための室内型全自動植物表現型解析システム RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) (Fujita et al. 2018)の開発と、これを用いた精密環境制御下における植物の環境応答と成長に関する解析について紹介する。

2. 自動フェノタイピングシステム RIPPS の開発

野外におけるフェノタイピングにおいては、生育環境情報を気象データやフィールドサーバーなどで収集した計測データにより把握し解析に利用するが、試験環境条件のコントロールおよび再現が困難であるのに対し、室内型のフェノタイピングにおいては、様々な環境条件を繰り返し再現できるメリットがある。これまでに、フランス国立農学研究所(INRA)の PHENOPSIS (Granier et al. 2006)および Phenoscope (Tisne et al. 2013)、ベルギーのフランダースバイオテクノロジー研究機関(VIB)の WIWAM (Lefebvre et al. 2009)、ドイツのレムナテック社のスキャナライザー (Rajendran et al. 2009)、理化学研究所の RIPPS (Fujita et al. 2018)など、様々なシステムが開発されている(Granier and Vile 2014; Humplik et al. 2015)。これらハイスループットで集約的な表現型解析システムは、様々な自動手法を組み合わせ、非破壊的に、植物の成長・形態および生理機能を解析することで、植物の一生を通じて成長や強靱性の

複雑さを再現性を持って示すことができる。これらの一例として、理化学研究所における全自動表現型解析システム RIPPS について解説する。

筆者ら理化学研究所の研究グループは、乾燥や高塩濃度などの環境ストレスに対する植物の耐性獲得機構の研究を行っている。乾燥ストレス応答の解析は、マンニトールやポリエチレングリコールなどを添加した高浸透圧培地により、乾燥状態を擬似的に再現するプレートを用いる方法も多く利用されているが(Verslues et al. 2006)、湿度変化に対する気孔の応答や蒸散量変化を解析するには、土壌を用いた鉢植え植物解析が適している。しかしながら、土壌を用いた乾燥試験は、培地などの方法に比べて困難な点が多い。培養室内の栽培棚や育成チャンバーにおける鉢植え植物の栽培試験においては、温度や湿度および光量のコントロールが可能な環境であっても、光の強さや空調の風むらなど、局所的な環境条件が異なっており、この微小な環境差異が試験経過に影響して、正しい結果が得られなくなる場合が少なくない。このような問題を避けるために、各試験区の反復数を増やし、サンプルをランダムに配置して、定期的に位置を移動するなどの対策を行うが、長期間の生育試験においては膨大な労力がかかるだけでなく、植物に接触あるいは障害ストレスがかかる場合もある。さらに、乾燥応答などを解析する際には、土の水分含量を把握し均一に維持するために、定期的な計量と給水の作業も加わり、手動では大量のサンプルを解析することが困難である。このような背景のもと、我々は、大量の植物を自動で育成し、画像取得により植物生長の経時変化を追うためのシステムを七ヶ高也博士（理化学研究所、現在はかずさ DNA 研究所）と(株)テックスと共同で開発した。

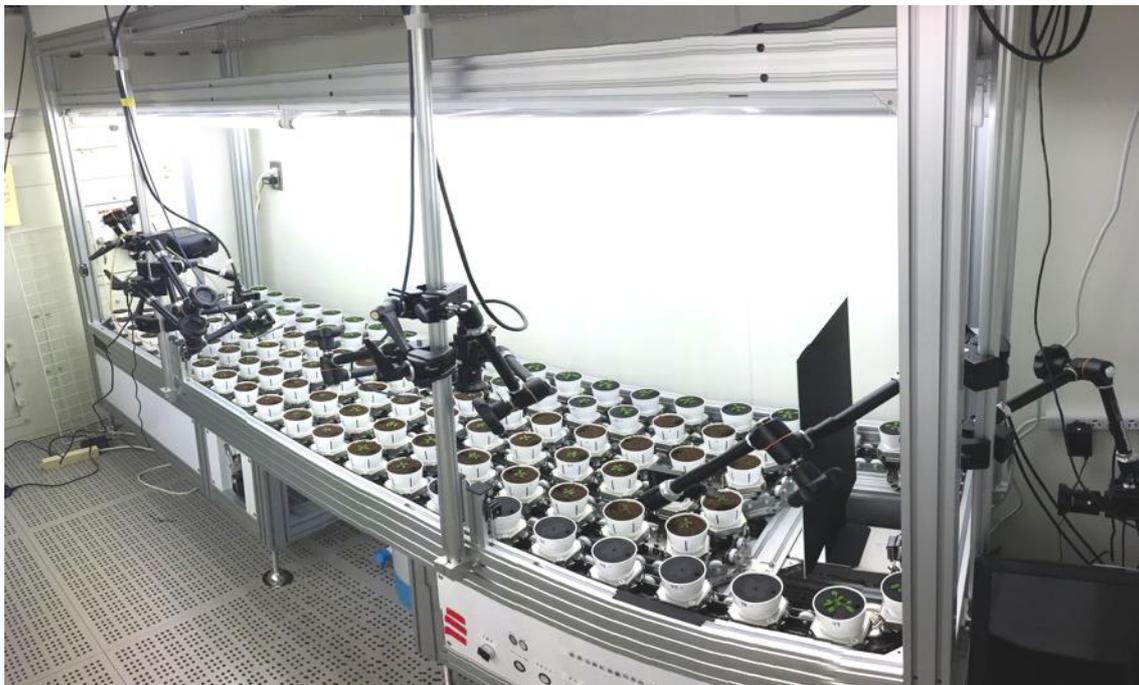


図 1 全自動表現型解析システム RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System)

RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) と名付けたこのシステムは、120 ポットの植物をベルトコンベアで搬送しながら育成を行う (図 1)。給水ポイントに停止した植物ポットは、上昇してくる天秤によって自動的に計量され、予めポット毎に設定した重量に達するまで給水が行われる。同時に、カメラの前に停止した植物は、自動的に画像取得が行われる。一連の動作が終わると、コンベアが 1 ステップ進み、次のポットの計量給水が行われる。1 ポットあたり約 1 分で計量動作が行わ

れ、約2時間で120ポットが一周する。この搬送システムにより、精密な土壌水分の制御と、植物成長の経時変化の記録ができるだけでなく、上述したポット位置によるサンプル間の微小環境の偏りをなくし、供試植物の生育条件を均質化することが可能になった。

RIPPSの照明装置は、任意の日長設定に加え、光強度をゼロから上限 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで無段階に調整できる。また、任意の位置にカメラシステムを設置・増設することが可能となっている。さらに、RIPPS装置は、個別の培養室に設置してあり、温度は 15°C から 35°C 、湿度は40%から85%まで、時間単位での制御が可能となっている。

3. RIPPS 画像解析システム

現行のRIPPSは、経時変化を追った画像解析を行うために、RGB・モノクロ、および赤外線、3種類のカメラを搭載している(図2)。カラー画像を取得するためのRGBカメラに加え、夜間画像の取得のために、暗所での植物生長に影響を与えない950 nmのLED照明を付属したモノクロカメラを搭載している。上面の画像からは、葉の色調および葉面積の経時変化を、側面の画像からは、避陰反応などの縦方向の形状変化も経時的に解析することが可能である。

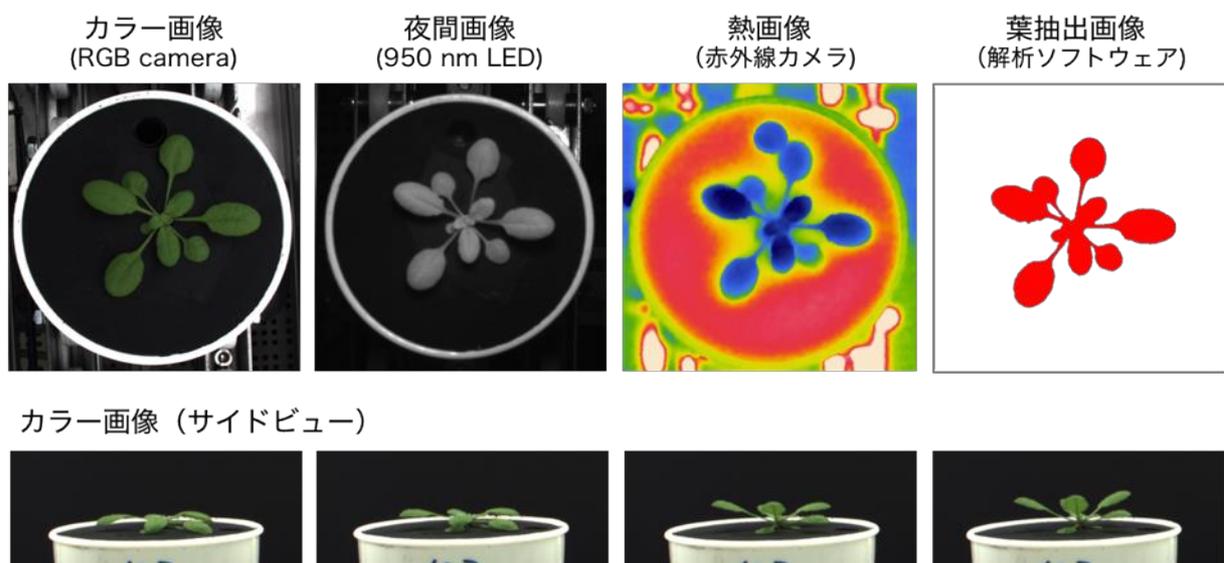


図2. RIPPS に搭載したカメラによるサンプル取得画像および画像解析ソフトウェアによる葉の抽出画像。側面の画像からは葉の上下運動が観察できる。

赤外線カメラによる葉の熱画像は、気孔の開閉を予測するツールとしてよく用いられている (Hashimoto et al. 2006; Merlot et al. 2002)。これは、気孔からの蒸散に伴い、気化熱が奪われて葉温が低下することから、葉温と蒸散量が高い相関を示すためである (Merlot et al. 2002)。RIPPSに赤外線カメラを搭載し、葉温の経時変化を追うことにより、土壌水分環境の変化に対する気孔の応答を、非破壊かつ高い時間分解能で解析することが可能となる。さらに、我々は、株式会社エルピクセルと共同して、可視カメラより得られた画像から葉の投影面積やロゼット径などを算出するソフトウェアを開発した。また、赤外線カメラより得られた熱画像から、葉面の平均温度を算出するソフトウェアの開発も行った。

前項で触れたように、RIPPS へのカメラ搭載は、移動や増設を自由に行うことができる。可視カメラを増設することで、画像解析の時間分解能を上げる、あるいは、植物体を立体的に捉えるための3D画像構築を行うことも可能となる。さらに、リモートセンシングなどで用いられている様々な分光測定法(中路, 2009)を取り入れることで、植物の生理状態をより詳細に解析することができる。例えば、植物の生産性とストレス状態の指標として用いられる光合成活性の非破壊計測法には、パルス振幅変調(PAM: pulse amplitude modulation)によるクロロフィル蛍光の測定(園池, 2009)や、カロチノイド色素の変化を反映し光化学系IIの活性とも関連のある光化学反射率(PRI: Photochemical Reflectance Index)の計測(Penuelas et al. 1995)などがある。さらに、近赤外における水の吸収帯の深さを指標化することにより、葉の水分含量を予測する方法も試みられている(Penuelas et al. 1997; Seelig et al. 2008)。近年では、数十から数百バンド以上の波長分解能を持つハイパースペクトルカメラを利用したイメージング技術が発達し(叶 & 酒井 2015)、糖分やミネラルの組成や量を推定する手法が開発されつつある(Suzuki et al. 2008)。モデル植物の遺伝学研究にも、ハイパースペクトルカメラの利用が進められている(Matsuda et al. 2012)。このような様々なイメージングシステムを組み合わせることで、RIPPS のより強力な定量的表現型解析ツールへの発展が期待できる。

4. RIPPS を用いたストレス耐性試験

RIPPS を用いた環境応答解析として、様々な土壤水分条件下での生育試験と塩ストレス耐性試験の例を紹介する。RIPPS では、1ポット毎に土壤水分含量を設定し、ポット重量を指標にして50 μl 単位の給水調節を行うことができる(図3)。乾燥区では、より早く目標水分含量に達するために、スリット入りのポット

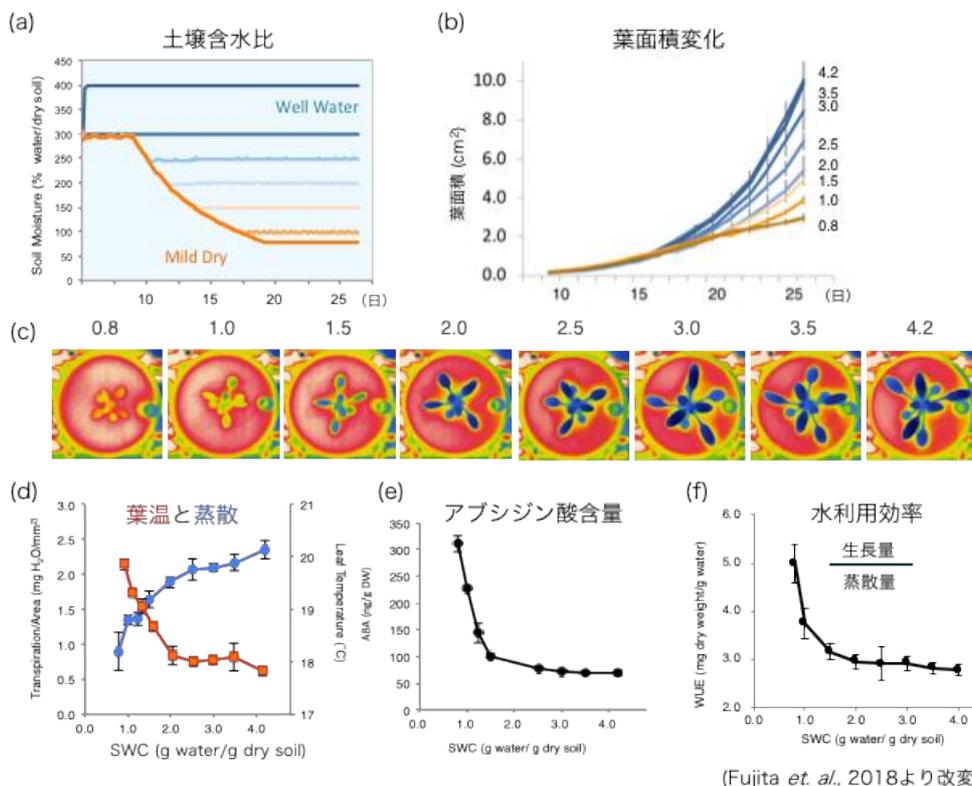


図3. 様々な土壤水分条件下での生育試験。(a)土壤含水比, (b)葉面積変化, (c)20日目植物の赤外線画像, (d)単位面積あたりの蒸散量と葉温の関係, (e)25日目植物のABA含量, (f)水利用効率

を利用している(図4a)。これらの技術により、任意のレベルの土壤水分状態を再現することが可能となり、手動では困難であった中間的なストレス状態、例えば、気孔の開度が中程度の状態(図3c)を観察することができるようになった。また、前項で解説したように、葉温で気孔の開閉および蒸散量を予測するだけでなく、重量変化を指標に、実際の植物の蒸散量計測を行うことができる。シロイヌナズナのような小さな植物体の場合、蒸散量算出においてポットの土表面からの蒸発が無視できないため、土を覆う必要がある。我々は、ポット内径に隙間なくフィットするスチロール製のカバーと、より口径の小さいプラスチックカバー(図4b)を用いて水分蒸発を防いでいる。さらに、植物を植えていないポットを同じ土壤水分条件で搬送し、給水口や鉢底からの蒸発分を差引くことで、植物からの正味の蒸散量を算出している。スチロールカバーは、土表面からの水分の蒸発を防ぐだけでなく、温度も遮断するため、赤外線カメラによる葉温観察におけるバックグラウンドの安定化にも役立っている。

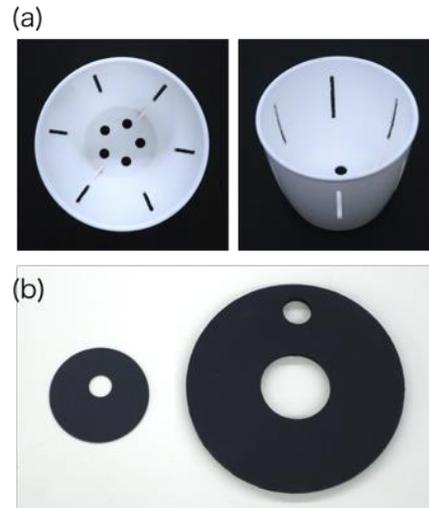


図4. (a) スリット入りポット
(b) ポットカバー

塩ストレス耐性試験(図5)では、あらかじめ決まった濃度の塩水を加えておき、土壤水分含量を維持することにより、水の蒸発による塩濃度の変化を抑え、塩濃度を一定に保つことができる。野生型のシロイヌナズナに比べて、塩排出ポンプ欠損変異体である *sos1* 変異体(Shi et al. 2000; Wu et al. 1996)においては、有意に高塩濃度における生育阻害が観察された(図5)。

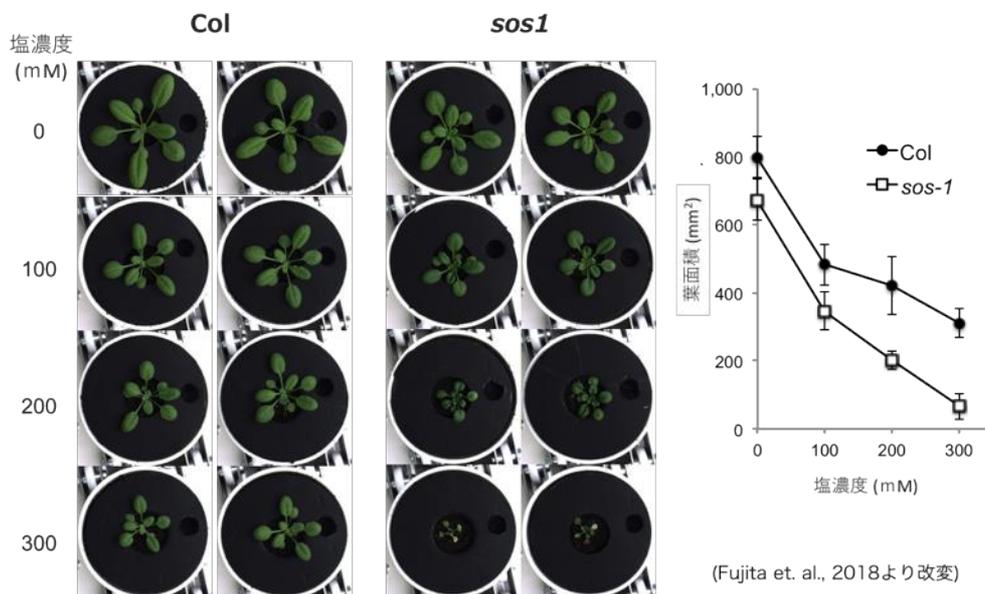


図5. RIPPS を用いた塩ストレス耐性試験. 野生型(Col)と塩排出ポンプ欠損変異体(*sos1*)の比較

このように、土壤水分を微妙に制御することができる RIPPS の特質を利用して、再現性の高い精緻な乾燥ストレスや塩ストレス試験をハイスループットに行うことができるようになった。また、高い時間分解能をもつ時系列データを得られることから、環境変動に対する植物の生理的变化を、より詳細に解析し理解することが可能になった。

5. おわりに

RIPPS で解析できるのは、モデル植物のシロイヌナズナにとどまらない。これまでに、単子葉植物のイネ科のモデル植物であるブラキポディウムに加えて、双子葉植物のコマツナやスーパーフードとして知られるキヌア(図6)などの作物を供試した定量的な表現型解析においても、RIPPS でしか解き明かせなかった精度の高い興味深い成果が出てきはじめています。このように、今後は、さまざまな植物種へと適用を広げていくことにより、圃場や植物工場、温室などさまざまな農業の現場で生産されている作物生産に貢献していくことが期待できる。

RIPPS は、均一な条件で植物を生育させ、成長の経時変化を追うことができるため、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス解析を組み合わせた統合解析や、植物の成長や環境耐性を高める化合物の探索(ケミカルスクリーニング)、多数の系統間比較による QTL 解析やゲノムワイド関連解析(GWAS)などのゲノム解析を行うことにより、植物の成長および環境応答のメカニズムの理解や有用遺伝子の発見が加速されると期待できる。また、RIPPS によって得られる、生育環境条件や蒸散量変化などの高次情報が付随した、様々な時系列画像の解析データを利用することで、植物の生長、環境応答に関わる数理モデルの構築を行い、作物の環境変動応答予測や最適



図6. RIPPS を用いたキヌアの成長解析

系統選抜などに役立つことも可能となる。さらに、今後、非破壊で植物の内部状態を把握できる画像装置などを RIPPS に搭載することにより、環境ストレス条件でのマーカーになる画像診断技術の開発などに利用できるだけでなく、多様な画像解析を機械学習と組み合わせることで、これまで見えてこなかった様々な環境条件での植物の成長に関する新しい生命現象を捉えられると期待できる。

謝辞

本研究の共同研究者である七夕高也博士(かずさ DNA 研究所)および浦野 薫博士(理化学研究所)に感謝申し上げます。キヌア種子は、国際農林水産業研究センターの藤田泰成博士に分譲いただいた。また、RIPPS の設計製作を行った(株)テックス、画像解析ソフトウェアの開発を行ったエルピクセル株式会社、RIPPS 部品加工およびポットスリット加工機の製作を行った理化学研究所技術基盤支援チーム、およびポットカバー製作を行った(株)トンボ、(株)東京プレジジョンに感謝の意を表す。本研究は、生研センター農食事業、文部科学省補正予算、理化学研究所 独創的研究提案「共生の生物学」、日本学術振興会・科学研究費補助金(基盤B特設分野 16KT0031 植物トリプトファン代謝系を利用した炭疽病菌と共棲菌の同時制御技術の開発)による支援のもとで行った。

引用文献

- Fujita, M., Tanabata, T., Urano, K., Kikuchi, S. and Shinozaki, K. 2018. RIPPS: A Plant Phenotyping System for Quantitative Evaluation of Growth Under Controlled Environmental Stress Conditions. *Plant and Cell Physiology* 59: 2030-2038.
- Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S.J., Dauzat, M., Hamard, P., et al. 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* 169: 623-635.
- Granier, C. and Vile, D. 2014. Phenotyping and beyond: modelling the relationships between traits. *Curr Opin Plant Biol* 18: 96-102.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I. and Iba, K. 2006. *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* 8: 391-U352.
- Humplik, J.F., Lazar, D., Husickova, A. and Spichal, L. 2015. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses - a review. *Plant Methods* 11.
- 叶 旭君 & 酒井 憲司 2015. ハイパースペクトルイメージングの農業への応用. 映像情報メディア学会誌 69-5: 464-469.
- Lefebvre, V., Kiani, S.P. and Durand-Tardif, M. 2009. A focus on natural variation for abiotic constraints response in the model species *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* 10: 3547-3582.
- Matsuda, O., Tanaka, A., Fujita, T. and Iba, K. 2012. Hyperspectral Imaging Techniques for Rapid Identification of *Arabidopsis* Mutants with Altered Leaf Pigment Status. *Plant and Cell Physiology* 53: 1154-1170.
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., et al. 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant Journal* 30: 601-609.
- 中路達郎 2009. 葉群の分光反射と分光反射指数. *Low temperature science* 67: 497-506.
- Penuelas, J., Baret, F. and Filella, I. 1995. Semiempirical Indexes to Assess Carotenoids Chlorophyll-a Ratio from Leaf Spectral Reflectance. *Photosynthetica* 31: 221-230.
- Penuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R. and Filella, I. 1997. Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R900/R970). *Int J Remote Sens* 18: 2869-2875.
- Rajendran, K., Tester, M. and Roy, S.J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell and Environment* 32: 237-249.
- Seelig, H.D., Hoehn, A., Stodieck, L.S., Klaus, D.M., Adams, W.W. and Emery, W.J. 2008. The assessment of leaf water content using leaf reflectance ratios in the visible, near-, and short-wave-infrared. *Int J Remote Sens* 29: 3701-3713.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6896-6901.

- 園池公毅 2009. クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定. *Low temperature science* 67: 507-524.
- Suzuki, Y., Tanaka, K., Kato, W., Okamoto, H., Kataoka, T., Shimada, H., et al. 2008. Field mapping of chemical composition of forage using hyperspectral imaging in a grass meadow. *Grassland Science* 54: 179-188.
- Tisne, S., Serrand, Y., Bach, L., Gilbault, E., Ben Ameer, R., Balasse, H., et al. 2013. Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant Journal* 74: 534-544.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45: 523-539.
- Wu, S.J., Ding, L. and Zhu, J.K. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.