

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」

研究課題

「液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御」

研究終了報告書

研究期間 平成18年10月～平成24年 3月

研究代表者：三村 徹郎

(神戸大学大学院理学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

液胞 (Vacuole) は植物、やカビに普遍的なオルガネラで、細胞体積の 80-90% を占め、空間充填、有用物質の貯蔵、細胞質の解毒・調節、代謝回転における分解機能など、様々な生理機能に深く関わっている。

本課題では、

1) 植物の各器官で多彩に分化した液胞内にどのような低分子が蓄積されているかを明らかにすることで、オルガネラメタボロームのための基礎データを確立する。

2) 液胞膜機能未知タンパク質を網羅的に改変する液胞膜エンジニアリングを進め、同時に、液胞と細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、境界膜としての液胞膜輸送体の変動が引き起こす代謝産物変化から、輸送機能の分子同定と解析を試みる。

3) 液胞膜の輸送機能を人為的に調節することで、細胞質で働く代謝機能を形質転換することなく代謝制御する可能性を探る。

ことを目指した。本研究は、植物細胞最大のオルガネラである液胞の機能を、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を組み合わせることで明らかにし、基礎植物科学としての液胞研究を進めるとともに、人類に有用な物質を蓄積する液胞機能の改変や、それによる細胞質代謝制御方法を検討する。

5 年半の研究期間中に以下の成果を得ることが出来た。

1. シロイヌナズナ培養細胞から単離したインタクト液胞を用いて、液胞を構成する液胞内タンパク質 (プロテオーム解析)、液胞内物質 (メタボローム解析) の網羅的測定を行った。

既に行っていた液胞膜プロテオーム解析から多数の機能未知タンパク質を見出していたが、液胞内タンパク質のプロテオーム解析からも、機能未知タンパク質を見出すとともに、酸化還元反応や転移反応を司る酵素が存在することから、新しい代謝経路が存在する可能性を見出した (三村グループ)。

CE-MS や LC-FT-ICR-MS を用いたメタボローム解析から、液胞に含まれる代謝物質を多数見出すことに成功した。特にこれまで液胞内には存在しないと想定されていた有機リン酸化合物等の一次代謝物質の存在を明らかにした (三村グループ、青木グループ)。

2. 単一細胞として巨大液胞を持つシャジクモ節間細胞を用いてメタボローム解析を行い、シロイヌナズナ液胞含有物との比較解析を進め、多数の一次代謝物質の存在を確認するとともに、その動態を明らかにした (三村グループ)。

3. 超高感度 12 テスラ FT-ICR-MS を用いた液胞内物質のノンターゲット解析から、分解産物も含め 3000 を超える物質が液胞内に存在することを見出した。また、これら物質の精密質量から、標準物質を用いずに複数の物質を同定することに成功した (三村グループ、杉山グループ、青木グループ)。

4. 薬用植物チャボイナモリを用い、液胞内に存在するとされるカンプトテシン生合成系の解析を進め、新しい中間代謝物質を同定した (山崎グループ、青木グループ)。

5. 機能未知液胞膜タンパク質の内、液胞膜輸送に関与すると想定される三つの輸送体 (MATE 輸送体 (At3g21690)、糖輸送体類似タンパク質 (At1g75220)、ABC トランスポーター (At3g62700)) について、過剰発現やノックダウンによる形質転換体を作成し、それぞれの単離液胞を用いたメタボローム解析を行うことで、各輸送体の基質探索を進めた。

液胞膜輸送体の形質転換では、二倍以上濃度が変化する代謝物質はごく少数であること、それにも関わらず濃度が大きく変動する物質が複数見出された。これらの中に輸送基質となり得るものが存在するかどうかは今後の検討による (三村グループ、青木グループ、杉山グループ)。

6. 液胞膜の機能未知の形質転換細胞のトランスクリプトーム解析を行うことで、輸送体の遺伝子発現変動が、細胞質の代謝過程にどのような影響を及ぼすかを検討し、一部代謝過程に変動が生じることを見出した。今後は、両者の関連を明らかにする必要がある (青木グループ、三村グループ)。

7. シソ・アントシアニン代謝系に属し、液胞膜タンパク質として知られる機能未知タンパク質の形質転換体からインタクト液胞を単離し、メタボローム解析を進め、機能同定を試みた(山崎グループ、三村グループ)。

8. 超高感度 12 テスラ FT-ICR-MS を用いて、モデル植物シロイヌナズナ植物体の代謝物質を網羅的に解析した。

本装置を用いることで、1ppm 以下の精度で各代謝物質の精密質量を決めることができることから、現在、シロイヌナズナ含有物質の精密質量データベースを公開するためのデータ整理を進めている(三村グループ、杉山グループ、青木グループ)。

(2) 顕著な成果

1. Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M. (2012) Lysine Decarboxylase Catalyzes the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis and Coevolved with Alkaloid Production in Leguminosae. *Plant Cell*, 24 1202-1216

概要:本研究は、メタボロミクスとトランスクリプトミクスの統合解析によりアミノ酸代謝からアルカロイド生産への分岐反応を触媒する鍵酵素の分子構造と酵素特性を明らかにしたもので、中心代謝(一次代謝)から特異代謝(二次代謝)への代謝分配および種間での代謝多様性分化の分子基盤を明らかにした。

2. Oikawa A., Matsuda F., Kikuyama M., Mimura T., Saito K. (2011) Metabolomics of a single vacuole reveals metabolic dynamism in an alga *Chara australis*. *Plant Physiology* 157(2): 544-551, DOI:10.1104/pp.111.183772

概要:本研究は、神戸大学と理研鶴岡グループとの共同研究で、車軸藻節間細胞を用い、単一細胞の液胞内代謝産物と、液胞外代謝産物の同時メタボロミクス解析を、環境条件との関係で初めて明らかにした。単一細胞の解析では世界で最初の研究であり、また、液胞単離過程を経ずに液胞内溶液を単離できることから、高等植物単離液胞との比較材料としても重要なデータとなっている。

3. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M-H, Terao-Morita M., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T. (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 50 (12) : 2023-2033.

概要:本研究は、シロイヌナズナ植物体と培養細胞を用い、高塩処理環境で液胞の構造がダイナミックに変動すること、液胞への塩分隔離に小胞輸送過程が重要な働きをしていることを初めて明らかにし、液胞機能の一つである解毒作用の生理機構の新しい反応を明らかにした。液胞に集積する低分子として、有機代謝産物と無機イオンがともに重要な物質であることを示している。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

液胞は、植物細胞最大のオルガネラであり、細胞内環境のホメオスタシス、代謝活性の維持に必須の働きをしている。液胞膜で機能する膜タンパク質は、液胞機能の基礎となるが、分子レベルで機能が明確になったものは少ない。

1) 液胞膜に存在する機能未知タンパク質を網羅的に改変する液胞膜エンジニアリングを進め、同時に、液胞と細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、境界膜としての液胞膜輸送体の変動が引き起こす代謝産物変化を、膜の両側で調べ、輸送機能の分子同定と解析を試みる。

2) 液胞による細胞質環境維持機構は、代謝産物の蓄積とともに、細胞質代謝活性に直接的影響を与える。そこで、液胞膜の輸送機能を人為的に調節することで、細胞質で働く代

謝機能を形質転換することなく、代謝制御する可能性を探る。液胞膜輸送機能の改変は、植物液胞に貯まることが知られている有用物質の生産可能性の新しい道を開くものである。

＜研究計画とその進め方＞

1. 液胞膜を境界とする二つの細胞内コンパートメント蓄積化合物の網羅的解析

モデル植物として知られるシロイヌナズナの培養細胞、植物体を初めとして、種々の植物細胞からインタクト液胞を単離する技術を開発していた。液胞内の物質蓄積を解析するには、単に液胞膜を単離するのではなく、丸ごとの液胞をインタクトの状態に単離する必要がある。この技術はすでに確立していた。

本研究課題では、このインタクト液胞単離技術を用いて、液胞内の低分子化合物を網羅的に解析することで、オルガネラターゲット型のメタボローム解析を目指した。物質解析は、FT-ICRMS や CE-MS、IC-MS などの質量分析手法を用いる。コントロールとしてのシロイヌナズナ培養細胞からの単離液胞含有産物の測定は、計画の前半で終わらせる。

また、細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、生理条件によって、境界膜としての液胞膜を介した二つの細胞内コンパートメント蓄積化合物がどのように変動するかを比較できる実験系を確立する。細胞質の物質解析には、ミニプロトプラスト、細胞膜に小孔を開ける手法、あるいはガラス微小細管による細胞質物質の抽出などを用いる。この実験のために最も有効な手法の検討を行うとともに、産物同定も進める。

2. 液胞膜に存在する機能未知タンパク質の解析

インタクト液胞単離技術を応用して、シロイヌナズナ液胞膜のプロテオーム解析を終えていた。その中から、複数の機能未知タンパク質を見出し、その一部についてタバコ培養細胞での過剰発現体を作成している。また、シロイヌナズナでこれら液胞膜機能未知タンパク質のノックアウト、あるいはノックダウンシステムを作成中である。これら液胞膜輸送体の形質転換株における、液胞内産物、細胞質産物の解析を行うことで、膜タンパク質の機能推定を行う。この実験は、網羅的に進める必要があり、可能なタンパク質について、研究年度中順次行っていく予定である。

3. 液胞膜タンパク質の発現制御による代謝変動解析

機能未知あるいは既知液胞膜タンパク質の形質転換体で明らかにできたメタボローム解析と、そこで発現している酵素群のトランスクリプトーム解析とを組み合わせ、すでにかずさ研究所で開発されている植物細胞代謝解析プログラム上で統合し、液胞膜の改変により生じる植物細胞の代謝システム制御の全体像を明らかにすることを目指した。

研究課題の遂行にあたっては、三村グループが液胞膜タンパク質の形質転換系の確立、液胞の単離を行うとともに、CE-MS あるいは IC-MS を使って無機イオンを中心とした物質の解析を行う、杉山班、青木班が、それぞれ FT-ICRMS を用いて、代謝化合物の網羅的分析を進める。また、山崎班では、液胞に蓄積されることで、特に人間生活とも関係の深い二次代謝産物の解析を行うことを予定した。さらに、細胞内代謝動向の解析をトランスクリプトームとバイオインフォマティクスを組み合わせる。これは、三村班、青木班、山崎班が共同して行うことを計画した

(2)新たに追加・修正など変更した研究構想

1. 研究を進めていく中で生まれた新たな計画研究

★モデル植物シロイヌナズナ含有物質の精密質量データベースの構築

杉山グループが主に進める 12 テスラ FT-ICR-MS による測定を用いることで、小数点以下 5 桁までの精密質量を 1ppm の精度で求めることができる。通常、質料分析器を用いた測定の欠点は、たとえ TOF (Time of Flight) 型の MS を使用したとしても、測定できる質量は高々ミリマスにならざるを

得ない。この時、一つの分子量に対して、数百の候補分子が出来ることが多い。かずさ DNA 研究所では、9テスラの FT-ICR-MS を用いた測定を進めているが、それでも尚、多数の候補物質が出て来ざるを得なかった。杉山グループがアメリカ合衆国 Old Dominion University の 12 テスラ FT-ICR-MS で測定を進める過程で、この精度で精密質量を与えることができれば、たとえ物質名が同定出来なかったとしても、より精度の悪い分子量データから、およその精密質量を知ることができるだろうと思いついた。

12 テスラ FT-ICR-MS は全世界でも台数が限られていて、本研究ではアメリカ合衆国 Old Dominion University の Hatcher 教授のご好意で測定させていただいた。国内では、産総研が同じ分析器を所有していたが現在では停止していることから、この機会にシロイヌナズナ含有物質の精密質量データベースを作成することを目的に、シロイヌナズナ植物体の茎葉部、地下部について、可能なデータを取ることに成功した。

測定感度が極めて高いことから、混入物質と植物体固有の物質の仕分けにかなり苦勞し、また、インフュージョンによる分析と本機の特長から、低分子量側のピークが少なくなるという傾向があるが、数千物質の精密質量を明らかにすることが可能となった。現在、このピーク整理と可能な組成式のあてはめを行っており、それが終了次第、かずさ DNA 研究所から、公開することを予定している。

2. 修正点

★シロイヌナズナ培養細胞を用いた細胞質基質の代謝物質測定

当初の目的では、液胞膜タンパク質を形質転換した後、液胞内代謝物質と、細胞質代謝物質の同時測定を行うことを計画していたが、細胞膜に穴を空ける実験などからは、十分な測定物質を得ることが出来ないと判断されたため、細胞質(あるいは細胞質基質)の代謝物質の測定はあきらめることとした。

尚、共同研究を行っていた理化学研究所の及川博士によりシャジクモ節間細胞を用いて、液胞と細胞質の同時代謝物質測定が進められ、液胞膜を介した物質分布を実測で明らかにすることには成功している。

本研究では、細胞質物質の測定の代わりに、細胞全体での測定結果、液胞内物質と比較することで解析を行うこととした。

§3 研究実施体制

(1)「三村徹郎」グループ(神戸大学)

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
三村 徹郎	神戸大学大学院・理学研究科	教授	H18.10～H24.3
深城 英弘	神戸大学大学院・理学研究科	准教授	H18.10～H24.3
七條 千津子	神戸大学大学院・理学研究科	助教	H18.10～H24.3
関口 陽子	日本ダイオネクス(株)	研究員	H18.10～H24.3
大西 美輪	神戸大学大学院・理学研究科	学術推進研究員	H18.10～H23.9 (H23.10 離脱)
姉川 彩	神戸大学大学院・理学研究科	学術推進研究員	H19.11～H24.3
太田 美幸	神戸大学大学院・理学研究科	技術補佐員	H19.01～H19.10 (H19.10 離脱)
上原 健生	神戸大学大学院・自然科学研究科	博士後期課程3年生	H19.02～H21.03 (H21.03 離脱)
角浜 憲明	神戸大学大学院・理学研究科	博士後期課程3年生(CREST RA)	H21.04～H21.06 (H21.06 離脱)

② 研究項目

1. 植物細胞からの液胞単離と液胞単離技術の改良

2. 液胞膜機能未知輸送体形質転換体の作成と液胞の単離

3. 液胞内容物のメタボローム解析、プロテオーム解析

(2)「山崎」グループ

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
山崎 真巳	千葉大学大学院薬学研究院	准教授	H18.10～H24.3
Supaart Sirikantaramas	千葉大学大学院薬学研究院	日本学術振興会 外国人特別研究員	H18.10～H20.3 (H20.3 離脱)
浅野 孝	千葉大学大学院薬学研究院	研究員	H19.4～H21.3 (H21.3 離脱)
中林 亮	千葉大学大学院薬学研究院	リサーチアシスタ ント	H21.4～H21.10 (H21.10 離脱)
Somnuk Bunsupa	千葉大学大学院薬学研究院	院生	H21.4～H23.3 (H23.3 離脱)
弓削千容	千葉大学大学院薬学研究院	研究補助員	H21.4～H23.7 (H23.7 離脱)
中林 亮	千葉大学大学院薬学研究院	研究員	H21.10～H22.3 (H22.3 離脱)
中村 道美	千葉大学大学院薬学研究院	研究員	H23.4～H24.3

②研究項目

- ・二次代謝の異なる品種および培養組織のトランスクリプトーム解析
- ・二次代謝の異なる品種および培養組織のメタボローム解析
- ・二次代謝関連遺伝子導入による代謝エンジニアリング

(3)「杉山裕子」グループ

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
杉山 裕子	兵庫県立大学環境人間学部	准教授	H18.10～H24.3
和田 千弦	兵庫県立大学環境人間学研 究科	M1～2	H19.4～H.21.3 (H21.3 離脱)
橋田 紳之介	兵庫県立大学環境人間学研 究科	M1～2	H20.4～H22.3 (H22.3 離脱)
北野 史子	兵庫県立大学環境人間学研 究科	M1	H.22.4～H.23.3 (H23.3 離脱)

②研究項目

- ・超高分解能質量分析装置(FT-ICR MS)を用いた液胞代謝産物解析

(1)「青木」グループ

①研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
青木 考	生体機能応用研究室	特別客員研究員	H18.10～H24.3
飯島 陽子	同上	研究員	H18.10～H22.3 (H22.3 離脱)
櫻井 望	ゲノムバイテク研究室	研究員	H18.10～H24.3
佐々木 亮介	生体機能応用研究室	プロジェクト技術	H19.4～H23.10

		員	(H23.10 離脱)
時田 岳亮	同上	プロジェクト研究員	H18.10～H19.3 (H19.3 離脱)
羽生 美智子	同上	研究補助員	H20.4～H20.6 (H20.6 離脱)
磯崎 二未	同上	研究補助員	H21.4～H22.3 (H22.3 離脱)
印出 美幸	同上	研究補助員	H22.4～H23.3 (H23.3 離脱)
永島 良樹	同上	プロジェクト研究員	H23.11～H24.3

②研究項目

- 液胞膜タンパク質形質転換培養細胞由来の単離液胞代謝物の解析
- 液胞膜タンパク質形質転換植物体の代謝物解析
- 液胞膜タンパク質形質転換培養細胞および植物体でのトランスクリプトーム解析

§ 4 研究実施内容及び成果

★研究チームの協力関係について

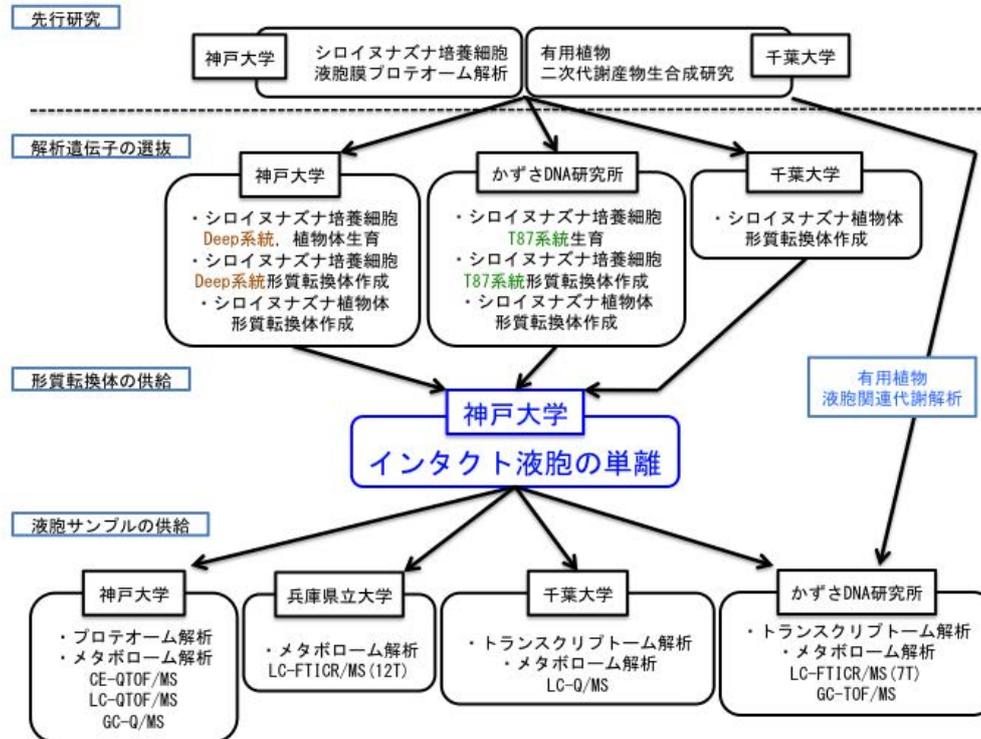


図 1. 研究実施体制

各グループの研究実施内容について個別に説明を加えるまえに、本研究チームの協力関係の全体像を示しておく。

本研究課題は、先行研究で三村グループが明らかにした液胞膜プロテオーム解析による多様な液胞膜タンパク質と、山崎グループが進めていた液胞における二次代謝産物生合成研究を元に、その中から機能未知のタンパク質を選抜し、シロイヌナズナ培養細胞と植物体に形質転換をし、タンパク質の機能解析を行うとともに、液胞に関連する代謝過程の新しい制御機構を開発することを目指したものである。

選抜した遺伝子について、神戸大学とかずさDNA研究所において、それぞれシロイヌナズナ培養細胞 (Deep 系統) と培養細胞 (T87 系統)、及び植物体について、形質転換体を作成した。当初の予定では、Deep 系統のみを使用する予定であったが、Deep は暗所培養であるため、光依存的に生合成される代謝物の解析には適さないという主たる理由から、当初予定には無かった T87 系統での形質転換体作製を開始した。また、一部植物体形質転換体は千葉大学においても作成されている。

作成された形質転換体を神戸大学で生育させるとともに、インタクト液胞を単離し、プロテオーム解析、メタボローム解析の標品として、4 つのグループに供給し、それぞれが質量分析を行うことで共同研究を進めている。

液胞サンプルに対して、

神戸大学では、LC-QTOF-MS を用いたプロテオーム解析、及び CE-QTOF-MS を用いたメタボローム解析をターゲット解析とノンターゲット解析の二つの手法で進めている。また、最終年度にはトランスクリプトーム解析も行いつつある。

かずさDNA 研究所と兵庫県立大学では、液胞サンプルについて、それぞれ FT-ICR-MS をもちいた網羅的解析を行っている。兵庫県立大学の杉山博士は、アメリカ合衆国 Old

Dominion University の Patrick Hatcher 教授の下で、世界最高性能の 12 テスラ FT-ICR-MS を用いた解析を行い、代謝産物の超精密質量の測定に成功している。かずさ DNA 研究所では、LC-FT-ICR-MS で解析を進めた。

千葉大学では、主として二次代謝産物に特化した LC-Q-MS による解析を進めている。

また、かずさ DNA 研究所と千葉大学において、有用植物チャボイナモリの二次代謝過程、及び液胞タンパク質の形質転換体について、トランスクリプトーム解析も同時に進行させている。

同一、あるいは関連サンプルについて、各グループの解析結果を持ち寄り、その後の研究方向を議論しながら、解析を進めている。

4. 1 植物細胞液胞の分子機能解析と液胞膜エンジニアリングによる植物代謝制御 (神戸大学 三村グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

植物細胞における液胞の機能を明らかにするために、様々な細胞からインタクト液胞を単離する技術を開発している。単離したインタクト液胞を用いて、液胞内で働くタンパク質のプロテオーム解析、液胞に蓄積される物質のメタボローム解析を行う。また、液胞膜輸送系タンパク質を形質転換することで、機能未知タンパク質の働きを明らかにするとともに、液胞機能の向上と改良の可能性を探る。

1) 各種培養細胞および植物体からのインタクト液胞の単離。

シロイヌナズナ培養細胞 (Deep 系統)、及び植物体葉組織からインタクト液胞を単離する技術を確認した。インタクト液胞の単離は、1) プロトプラストの作成、2) 浸透圧ショックあるいは機械的処理によるインタクト液胞の単離、3) 密度勾配遠心を用いた単離インタクト液胞の純化の過程を経て行う。それぞれの野生型細胞からインタクト液胞を単離し、液胞膜タンパク質のプロテオーム解析、液胞内タンパク質のプロテオーム解析、液胞内含有物のメタボローム解析を行った。

また、かずさ DNA 研究所で使用している T87 系統についても、インタクト液胞単離手法を確認した。

2) シロイヌナズナ培養細胞 (Deep 系統) の形質転換法の確立

シロイヌナズナ植物体には、確立された形質転換法があるが、本研究室で解析に使用してきた Deep 系統は、従来から形質転換が難しいと言われており、形質転換系の確立は不可能ではなかったが、植物体のような確立した方法は知られていなかった。タバコ培養細胞 BY-2 株形質転換のために確立された手法を参考に、形質転換用アグロバクテリウムの作成、アグロバクテリウム培養法と形質転換のための接種時期の確定、アグロバクテリウムの接種時期と同調させた培養細胞の成長状態などを詳細に検討した結果、Deep 細胞を形質転換する一般的手法を確認した。

3) 形質転換細胞からのインタクト液胞単離手法の確立

形質転換植物体、及び形質転換培養細胞は、それぞれ成長曲線、細胞壁の状態、液胞の密度などに違いがでるため、野生型の液胞単離手法をそのまま応用することは出来ない。そこで、形質転換液胞の単離技術の開発を進めた。

4) 単離インタクト液胞を用いたプロテオーム解析

野生株から単離したインタクト液胞をもちいて、液胞膜および液胞内タンパク質のプロテオーム解析を行った。プロテオーム解析は、Agilent 社の nanoLC-Tip-QTOF-MS を用い、ショットガン法で行った。質量分析データは、Mascot を用い、TAIR ver.9 のデータベースを用いて解析を行った。

5) 単離インタクト液胞を用いたメタボローム解析

野生株、形質転換細胞から単離したインタクト液胞をもちいて、液胞内物質のメタボローム解析を行った。メタボローム解析は、Agilent 社の CE-QTOF-MS を用い、Positive, Negative の二つのモードを進めた。また、神戸大学への CE-QTOF-MS の導入および解析

手法が確立するまでに、相当程度の時間がかかることが予想されたため、液胞内代謝産物のターゲット分析を、福崎英一郎博士、原田和生博士(大阪大学)と、斉藤和季博士、及川彰博士(理化学研究所 Plant Science Center)の協力のもと、それぞれの研究室におけるCE-MSを用いて行った。

6) シャジクモ節間細胞の液胞及び細胞質のメタボローム解析

シロイヌナズナ液胞で見出された代謝産物と比較するため、液胞液の単離が容易なシャジクモ節間細胞を用いて、斉藤和季博士、及川彰博士とメタボローム解析を行った。また、及川博士に協力して、細胞質と液胞間の物質動態について解析を進めた。

1. 液胞膜および液胞内に含まれるタンパク質の解析

液胞機能を司る実体として重要な分子は、液胞膜と液胞に含まれるタンパク質である。我々は、液胞膜タンパク質のプロテオーム解析を行うことで、これまでに多数の未知タンパク質を見出しており、それらが実際に液胞膜に存在することをGFP融合タンパク質を用いた細胞内局在解析から明らかにしている。

さらに、液胞内代謝過程の存在を確認するために、液胞内タンパク質のプロテオーム解析を行った。液胞が分解系コンパートメントであることを示す加水分解酵素の他に、酸化還元酵素、転移酵素など、様々な代謝系酵素が見出された(表1)。これまで液胞膜に機能未知の酸化還元酵素などが存在することが知られていたが、液胞膜を介した酸化還元能の移動などと組み合わせることで、液胞内でどのような機能を果たしているのかを明らかにする必要がある。

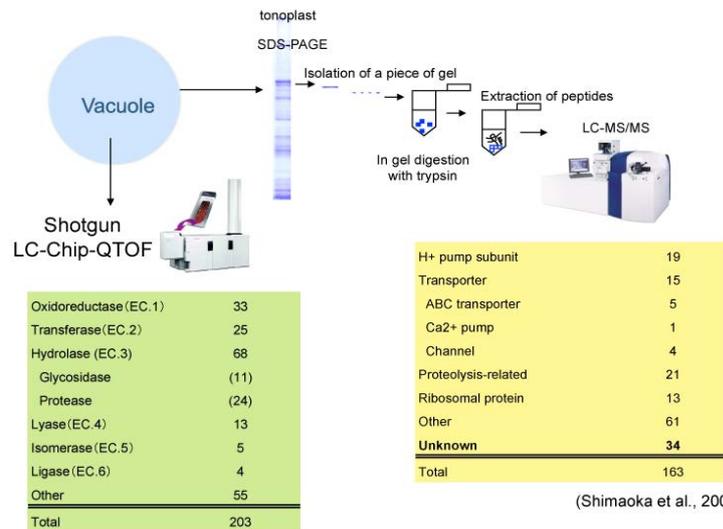


図2. 液胞膜及び液胞内タンパク質のプロテオーム解析

表1: 液胞内に含まれるタンパク質

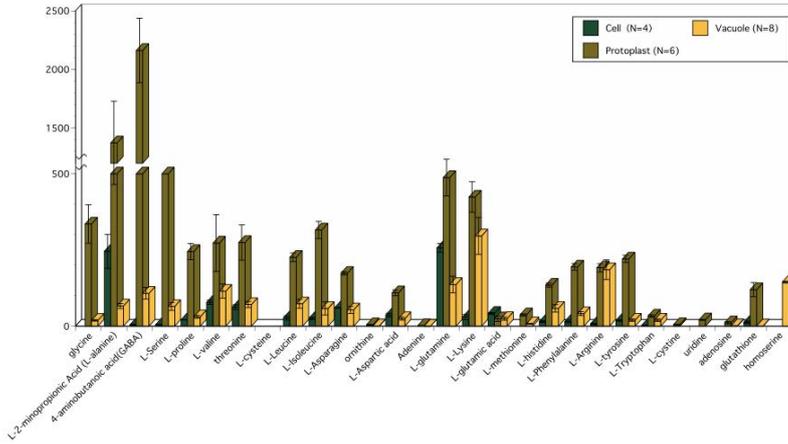
Rank	Locus	matched peptides	EC number	Tair Description
1	At1g1580	701	EC.3	AtPMEPCRA; pectinesterase; similar to pectin methyltransferase, putative
2	At3g26720	252	EC.3	glycosyl hydrolase family 38 protein
3	At4g08770	240	EC.1	peroxidase, putative; Identical to Peroxidase 37 precursor (PER37)
4	At2g36530	223	EC.4	Involved in light-dependent cold tolerance and encodes an enolase.
5	At2g24200	200	EC.3	cytosol aminopeptidase; Identical to Leucine aminopeptidase 1 (PM25)
7	At3g02230	194	EC.2	reversibly glycosylated polypeptide possibly involved in plant cell wall synthesis
8	At4g30920	186	EC.3	cytosol aminopeptidase family protein; Identical to Leucine aminopeptidase 3, chloroplast precursor
9	At3g20370	185	-	mepirin and TRAF homology domain-containing protein / MATH domain-containing protein
10	At5g19550	183	EC.2	Nitrogen metabolism. Major cytosolic isoenzyme controlling aspartate biosynthesis in the light.
11	At3g55260	179	EC.3	Encodes a protein with β -hexosaminidase activity (the enzyme is active with p-nitrophenyl- β -N-acetylglucosaminide as substrate but displayed only a minor activity toward p-nitrophenyl- β -N-acetylgalactosaminide).
12	At5g15650	166	EC.2	Reversibly Glycosylated Polypeptide-2
13	At1g79690	165	EC.3	ATNUDT3 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 3)
14	At4g08780	143	EC.1	peroxidase, putative; Identical to Peroxidase 38 precursor (PER38)
15	At3g56310	140	EC.3	alpha-galactosidase, putative
16	At4g20850	122	EC.3	Tripeptidyl Peptidase II. Ser protease that assembles into a large oligomeric complex containing two proteins of 153 and 142 kD that are derived from a single TPP2 gene, with the smaller version missing part of the C-terminal end.
17	At1g54010	118	EC.3	myrosinase-associated protein, putative
18	At5g18170	114	EC.1	encodes the beta-subunit of the glutamate dehydrogenase. The enzyme is almost exclusively found in the mitochondria of stem and leaf companion cells.
19	At2g05710	113	EC.4	Protein is tyrosine-phosphorylated and its phosphorylation state is modulated in response to ABA in Arabidopsis thaliana seeds.
20	At5g17920	107	EC.2	Encodes a cytosolic cobalamin-independent methionine synthase, involved in methionine regeneration via the activated methyl cycle (SAM cycle). The protein undergoes thiolation following treatment with the oxidant tert-butylhydroperoxide.
21	At5g42980	104	EC.1	encodes a cytosolic thioredoxin that reduces disulfide bridges of target proteins by the reversible formation of a disulfide bridge between two neighboring Cys residues present in the active site.

2. 植物細胞からの液胞単離と液胞内物質のメタボローム解析

液胞メタボロームの基盤データとするため、シロイヌナズナ培養細胞 Deep 系統および植物体から単離したインタクト液胞について、代謝産物の解析を CE-MS を用いて行った。そ

の際、液胞内物質の存在量、細胞全体の含有量を、液胞内標識酵素であるマンノシダーゼ活性を基準に比較した。

これまで知られていた多くの有機酸、アミノ酸が改めて見いだされた。液胞内含有量についても、これまでの文献値に近い値を見いだすことができた。一部のアミノ酸では、細胞内含有量が、単離液胞よりも小さくなったものが見出された。



インタクト液胞を単離するためには、植物細胞の細胞壁を除いたプロトプラストの作成が必須であり、そのためセルラーゼ等の酵素類で3時間程処理する必要がある。この間に代謝産物の濃度が変動する可能性を検討し、多くのアミノ酸では、プロトプラスト作成中に細胞内濃度が大きく上昇することを見出した。単離液胞における代謝物解析には、この可能性を考慮する必要があることが判った。

ターゲット分析で明らかになった各代謝化合物をメタボリックマップにあてはめたのが図4である。これまで知られていたことではあるが、代謝末端にあるアミノ酸と、TCA回路中の特有の有機酸が、特に液胞に蓄積することが示された

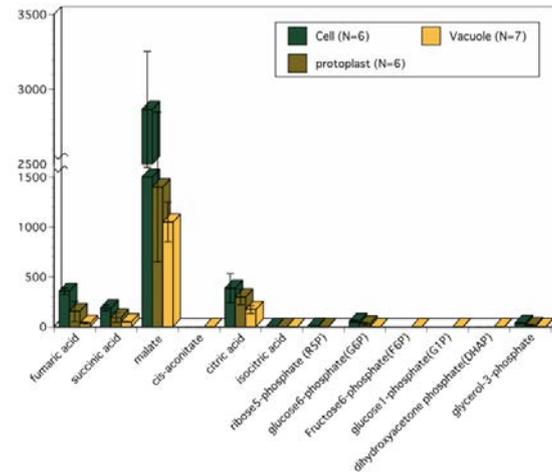


図3. シロイヌナズナ単離液胞に見出され、CE-MSで定量された代謝産物。
上：Positive modeでの測定
左：Negative modeでの測定

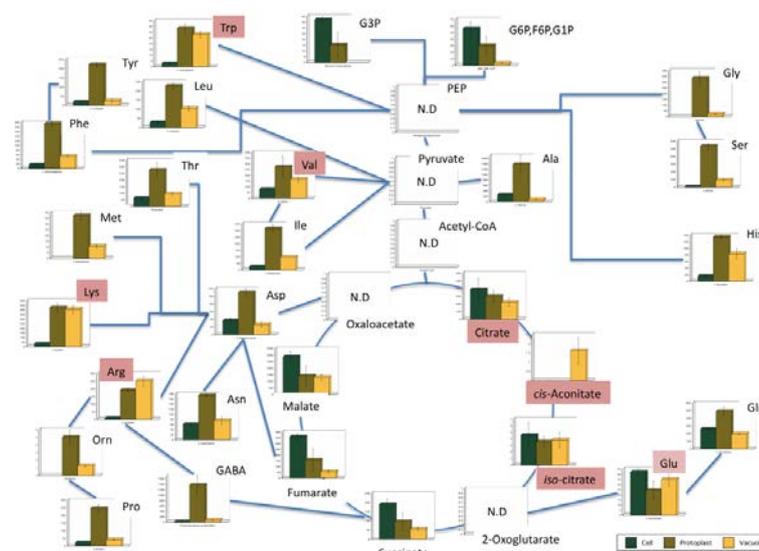


図4. 代謝マップ上にあてはめた各種化合物の細胞内分布。

一方、これまで液胞内には存在が知られていなかった多数の有機リン酸化合物が見いだされた。これは教科書にも知られていない新しい知見である。これら有機リン酸化合物は、濃度自体は高いものではないが、明らかに液胞内に存在することから、これまで想定されていなかった植物細胞のリン酸代謝において液胞が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。本実験系では、オルガネラ単離過程での細胞質低分子化合物の混入や、

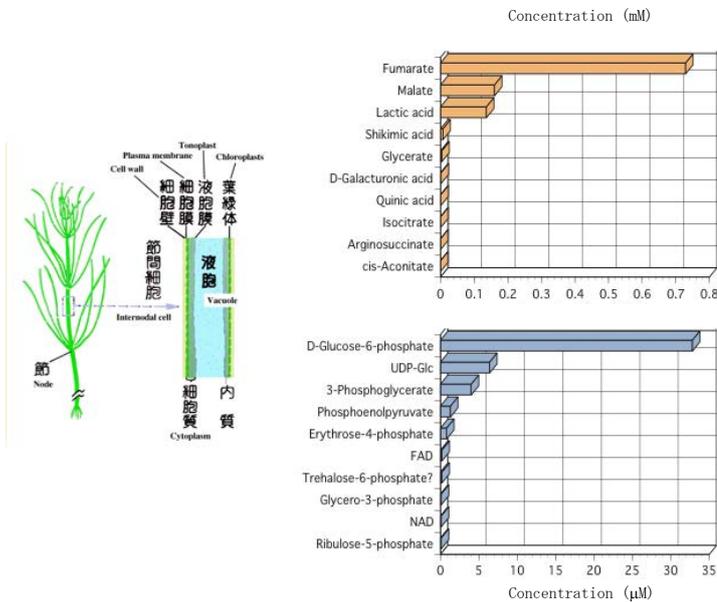


図5. シャジクモ節間細胞模式図と、シャジクモ液胞液に含まれていた代謝化合物

オルガネラであることが明らかとなった(図6)。

現在、これらの有機リン酸化合物がどのような機構で液胞内に輸送されるのか、またその生理学的意味が何かあるのかについて、液胞膜輸送系、オートファジー解析、プロテオーム解析および液胞内酵素活性測定などを組み合わせて検討中である。

理研とは、さらにシャジクモを用いた解析を進め、液胞と細胞質の間での代謝物質の分布及び、光環境に応じた分布動態を明らかにした(Oikawa et al. 2011) (図6)

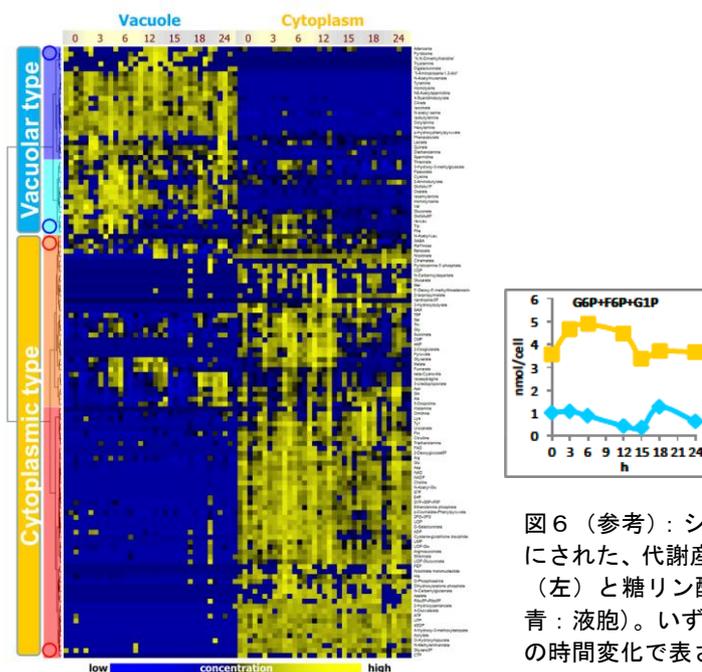


図6 (参考): シャジクモ節間細胞で明らかにされた、代謝産物の液胞、細胞質分布動態(左)と糖リン酸の分布(右、黄:細胞質、青:液胞)。いずれも明12時間、暗12時間の時間変化で表されている

3. 液胞膜機能未知タンパク質の形質転換と液胞内代謝産物の変動

液胞機能の解析のためには、液胞膜で機能しているタンパク質の機能解析が必須である。これまでに液胞膜プロテオーム解析で見出した機能未知タンパク質について、発現量を人為的に改変することで、液胞内物質の変動をメタボローム解析し、基質同定を進めることと、液胞膜輸送タンパク質の量的変動が、細胞質の代謝過程にどのような影響を与えるかの解析を進めた。

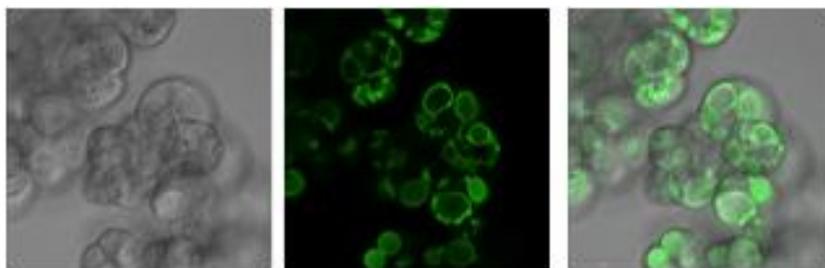


図7. 液胞膜タンパク質を形質転換した培養細胞

ここでは、MATE型膜輸送体 (At3g21690)、糖輸送体類似膜タンパク質 (At1g75220)、さらにABC輸送体 (At3g62700)の三種類の膜輸送系に着目して検

討を行った。MATE型膜輸送体、糖輸送体類似膜タンパク質については、青木グループにより詳細な解析が行われている(後述)。

三村グループでは、ABC輸送体を、シロイヌナズナ培養細胞で過剰発現させ、インタクト液胞を単離するとともに、メタボローム解析を進めた(図7)。

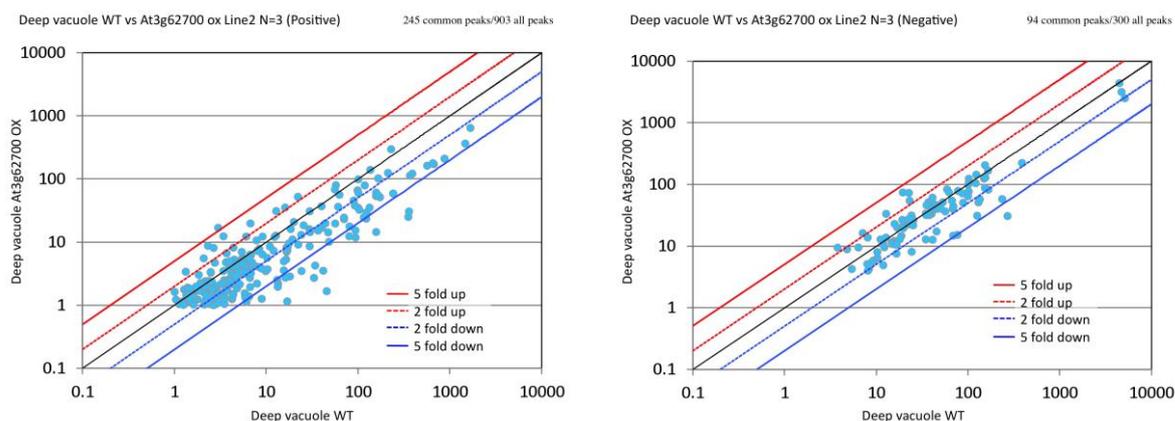


図8. ABC輸送体の過剰発現株から単離した液胞と野生株液胞に含まれる代謝産物含量の相対値比較。

左: Positive modeでの測定 右: Negative modeでの測定

CE-MSを用いたターゲット解析、ノンターゲット解析のいずれにおいても、多数の液胞内物質の量的変動が見出された。しかし、代謝物質の変動量は、そのほとんどが二倍内の増減に収まるものであり、5倍を超えて変動したものは20程度しかなかった。現在、異なる形質転換系列を用いてこの変動を確認するとともに、精密質量から物質の推定を進めている(図8)。

(2)研究成果の今後期待される効果

液胞内タンパク質を網羅的に明らかにした研究は、過去に一報あるが、その後は研究されていない。液胞内代謝産物の網羅的解析も本研究が始めてのものである。はじめにも書いたように、液胞は植物の生理機能の維持に重要なだけでなく、人類社会の存在が植物に負っている多様な化合物のほとんどを貯蔵する器官である。

私達が見出した新しい酵素系や代謝産物の実態は、いずれも液胞機能の多様性を示唆

するものである。

さらに、液胞膜輸送系タンパク質を形質転換すると、極く一部の代謝産物のみが大きく濃度変動を起こすことが示された。まだ形質転換したタンパク質と代謝産物の一義的關係付けは出来ていないが、液胞機能に関連するタンパク質を形質転換することで、植物の代謝過程を新しい側面から制御できる可能性を示唆するものである。

4. 2 液胞に関わる二次代謝を中心としたメタボローム解析とトランスクリプトーム解析 (千葉大学 山崎グループ)

(1)研究実施内容及び成果

植物液胞には、多様な植物二次代謝産物が蓄積される。そこで液胞機能を根本的に理解するためには、二次代謝との関係を考慮する必要がある。山崎グループでは、アミノ酸に由来して生産され液胞に蓄積するアントシアニン・フラボノイド類ならびに様々な生理活性を有するアルカロイド類の生合成・代謝経路の発現制御、細胞内物質輸送メカニズムを、トランスクリプトームならびにメタボローム解析を統合解析することにより明らかにし、植物細胞内の代謝ネットワーク制御に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

二次代謝の変異体である成分変種あるいは人工的に作出した二次代謝変異体についてトランスクリプトームならびにメタボロームの包括的解析を行い、これらを統合解析することによりメタボローム変動に関連する遺伝子群をプロファイリングした。さらに代謝制御の候補遺伝子について、機能解析を進めた。

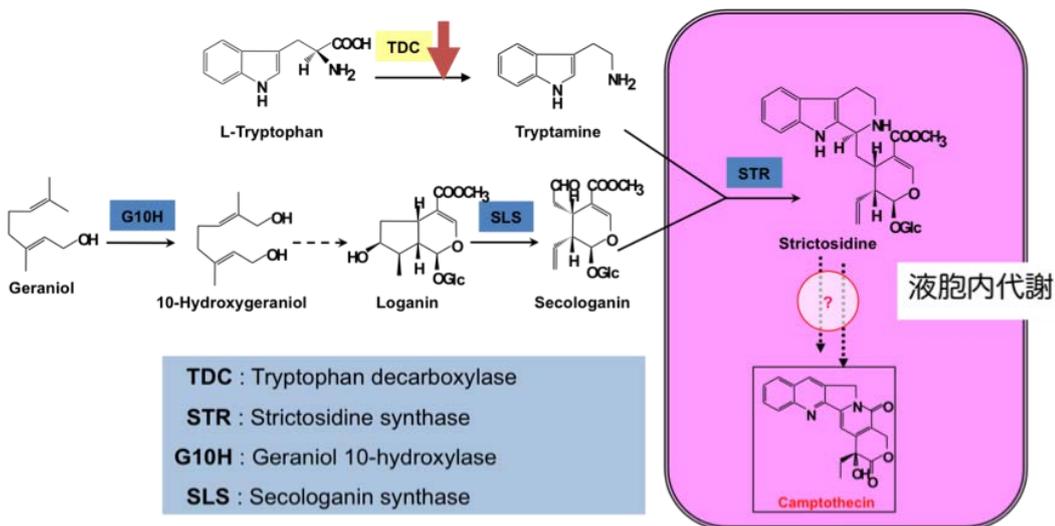


図9. カンプトテシン生合成と液胞

まず転写制御因子に関しては過剰発現体および遺伝子抑制体を作成してこれらの変異体におけるメタボロームならびにトランスクリプトーム変動を解析することにより導入遺伝子の代謝制御機能と標的遺伝子群を明らかにした。触媒酵素遺伝子については組換えタンパク質を用いた *in vitro* 機能解析ならびに遺伝子組換え植物における *in vivo* 機能解析を行い下記の成果を得た。

1. メタボロミクスとトランスクリプトミクスによるカンプトテシン生合成経路のマイニング

抗がん性アルカロイドであるカンプトテシンの生合成の初期段階は、ニチニチソウアルカロイドをはじめとする多くのインドールアルカロイドと共通であり、トリプトファン由来のトリプタミンとセコロガニンが縮合した生合成中間体ストリクトシジンを経るが、それ以降のカンプトテシンに特徴的な後期の生合成経路については、触媒酵素も生合成中間体もいまだに不明である。そこでメタボロミクスとトランスクリプトミクスを組み合わせることで生合成経路のマイニングを行った(図9)。

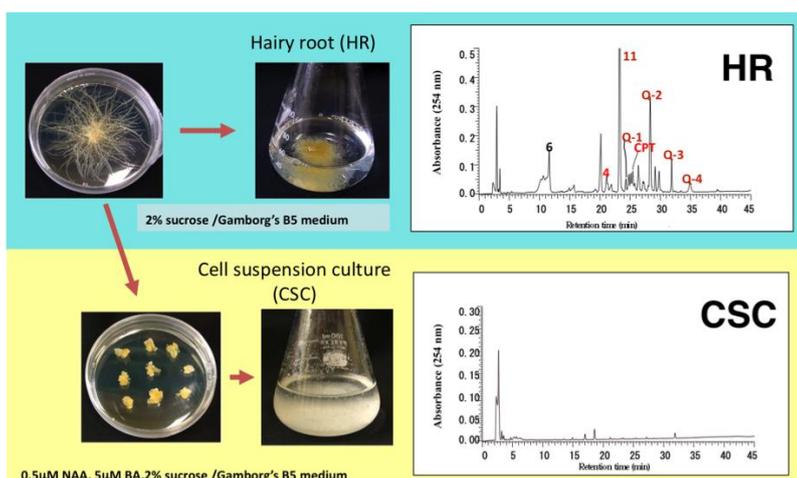


図10. チャボイナモリ毛状根では、多様な二次代謝産物が産生されるが、培養細胞ではそのようなものは産生されない。

トプテシンならびに既知の関連化合物の蓄積量が減少した。これらの RNAi 毛状根について LC/FT-MS 分析によるメタボローム解析を行い、カンプトテシン等と同様に減少する質量イオンピークをプロファイルし、それぞれの精密質量から組成式を推定した。これらを仮想生合成中間体と仮定するとカンプトテシン生合成の後期過程には、複数の酸化還元反応、脱水反応、脱グリコシル化などが関与することが示唆された。さらに TDCi 毛状根に 5-フルオロトリプタミンを添加した結果、複数の仮想生合成中間体のフッ素化体が検出されこれらがトリプタミン以降の生合成経路を構成する中間体であることが示された(図11)。

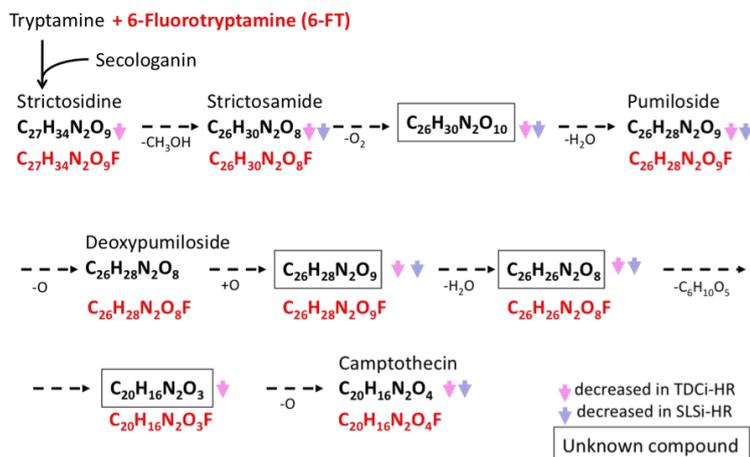


図11. 形質転換毛状根とメタボローム解析を用いて明らかになった液体内カンプトテシン生合成経路

OpMYB1 は、チャボイナモリの毛状根特異的に発現する遺伝子のプロファイリングによってクローニングされ、C 末端側に EAR (ERF-associated amphiphilic repression)モチーフを有する R2R3-MYB 転写因子であり、OpMYB1 を過剰発現させたチャボイナモリ毛状根では、カンプトテシン蓄積量の減少が見られる。そこでこの OpMYB1 過剰発現毛状根について次世代シーケンサー(イルミナ社 HiSeq2000)によるトランスクリプトーム解析を行った。これらのシーケンズデータについて pathway enrichment analysis および GO enrichment analysis を行ったところ、OpMYB1 過剰発現によりフェニルプロパノイド等の二次代謝経路および酸化還元に関与する酵素群が有意に変動していることが示された。この結果は、OpMYB1 が二次代謝制御に関与することを示すと同時に前項の RNA サイレncing で明

らかになったアルカロイド生合成とフラボノイド生合成との関係を再び示すものであった。今後、OpMYB1 の制御下にある遺伝子について詳細な解析を行う予定である。

2. キノリチジンアルカロイド生産とポリアミン代謝の関係の解明

ルピナス属植物はタンパク質原料および動物飼料として重要な作物であるが、含有されるキノリチジンアルカロイドによって作物としての利用が制限される。そのためにアルカロイドを含有する「ビター品種」とアルカロイド非含有「スイート品種」が育種されてきた。本研究では、ホソバルピナス(*Lupinus angustifolius*)のスイート品種とビター品種間で PCR-select cDNA subtraction を行うことによりビター品種特異的に発現する遺伝子をプロファイリングした。その結果、ビター品種特異的にアルカロイド生産への関与が推測される、オルニチン脱炭酸酵素、アミン酸化酵素、アシル転移酵素遺伝子ホモログ遺伝子が発現していることが明らかになった(図12)。次にプロファイルされた配列をもとに全長 cDNA (*LaDC*, *LaAO*, *LaAT*)を単離した。

LaDC を大腸菌で発現させた組換え酵素は、*in vitro* で高いリジン脱炭酸活性を示した。真核生物のオルニチン脱炭酸酵素は副反応としてオルニチンより炭素数が一つ多いリジンをわずかながら脱炭酸することが知られているが、それらに比べて *LaDC* は高いリジン活性を示し、ルピナスではその脱炭酸酵素反応によりキノリチジンアルカロイド前駆体であるカダベリンが供給されることが示唆された。また、カダベリンは一般的にマメ科に多く含まれるポリアミンであり、カダベリン

高含有もリジン脱炭酸酵素によるものと考えられる。*LaDC* を発現させたシロイヌナズナではカダベリンが蓄積した。また、*LaAT* は、BAHD ファミリーの中でもシロイヌナズナのポリアミンアシル転移酵素と最も相同性が高いことから、*LaAT* は、*LaDC* により過剰に生成するカダベリンの代謝に関与することが推測された。

今後、*LaAO* の機能解析を行う予定である。今後は、これらの酵素を異なる植物種で発現させることにより代謝エンジニアリングを行うことを予定している。

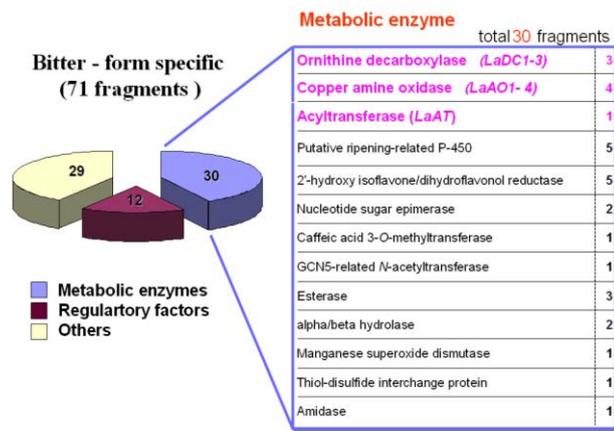


図 1 2. ビター品種特異的遺伝子フラグメント

3. アントシアニン蓄積に関わる新規液胞膜タンパクのエンジニアリングとメタボローム解析

アカジソとアオジソの mRNA differential display により得られた、アカジソ特異的膜タンパク質 8R6 は GFP 融合タンパク質の細胞内局在から液胞膜に局在することが示されている。シロイヌナズナには、3 つのホモログ遺伝子 (*ANMI*, 2, 3) が存在し、このうち *ANMI* がドミナントに発現し高シソ糖濃度や光照射などアントシアニン生産を誘導する環境下で発現誘導を受けることを明らかにしてきた。そこで、本研究では、シソ 8R6 を発現したシロイヌナズナおよび *ANMI* を抑制したアンチセンス植物を作成した。現在この植物体から液胞を単離しメタボローム解析を行っている。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究では、ゲノム情報の利用できない実用植物についてもメタボロミクスを基軸とした統合オミクス解析と逆遺伝学を展開することが可能であり、植物における多様な物質生産制御の解明への応用の可能性が示された。植物細胞内の代謝ネットワークをトランスクリプトームならびにメタボローム解析等により包括的に解析により得られた基礎的知見は植物を

利用した有用物質生産への応用展開が可能であり、今後のグリーンイノベーションに大いに貢献すると期待される。

4. 3 超高分解能質量分析装置を用いた液胞代謝産物解析（兵庫県立大学 杉山グループ）

(1)研究実施内容及び成果

FT-ICR MS は、現在のところ、その分解能において比肩する方法のない分析法であり、検出された m/z 値から未知物質の分子式を推定することのできる唯一の方法である。杉山グループは、12Tの超電導マグネットを備えたFT-ICR MSを用いて、液胞代謝物の網羅的解析を行うことを目的として研究を進めた。

測定に先立ち、塩類の除去を効果的に行うことのできる前処理(固相抽出・電気透析など)法を検討したところ、C18 固相抽出法では、処理を行うことにより検出ピーク数の大幅な増加が観察され、増加したピークが処理過程でのコンタミネーションである可能性が否定できない上に、処理によって質量スペクトルの形状があきらかに変化し、樹脂の特性より、低極性分子を優先的に捕集し、親水性物質は失ってしまう可能性が高いこと、電気透析ではコンタミネーションの少ない透析膜(cut off mw=300)を用いると、塩類と同時に低分子物質も除去されてしまうこと、が分かった。したがって、上記のような前処理は行わずに測定した結果から、培地のコントロール試料・試薬のコントロール試料の測定により得られるブランクピークを差し引いたマスリストを作成することにより、試料中の有機物質の網羅的解析を行う方針とした。

Deep 培養細胞の液胞・T87 過剰発現体の液胞・野生株の Shoot 細胞・Root 細胞から抽出された有機物質試料を各 3~5 チューブずつ調製し、インフュージョンにより、FT-ICR MS 測定を行ったところ、異なったバッチの試料間においても、再現性よくピーク検出が行われていることを確認した。また、付加体の検索を行ったところ、LC-MS 等では多数検出される付加体がほとんど検出されず、分子の同定が容易であるという利点があることもわかった。これらにより、ブランクピークを差し引いたピークのリスト(マスリスト)を作成することの妥当性を確認し、データベース化できることを確認した。試薬ブランク・培地ブランク・内標ブランクを差し引いたピークリストの作成を行った。ポジティブ分析ではDeep 培養細胞の液胞(1651)・野生株の Shoot 細胞(2080)・Root 細胞(2735)、ネガティブ分析ではDeep 培養細胞の液胞(1758)・野生株の Shoot 細胞(2191)・Root 細胞(2450)と多数のサンプル由来ピークを分離し、リスト化することに成功した。

さらに、このリストに含まれるピークのなかに含まれている既知物質の検索を行った。KNapSAck データベースにヒットしたピークはネガティブ分析ではDeep 培養細胞試料(106)、Shoot 細胞(187)、Root 細胞(318)であった。

また、上記リストの質量イオンピークの分子式の推定を網羅的に行うことにも取り組んだ。分子式の候補の絞り込みには、MatLab を使い、炭素の安定同位体ピークをリストから除いた後、 $0/C < 1.2$, $H/C < 2.25$, $H/C > 0.35$, $N/C < 0.5$, $S/C < 0.2$, $P/C < 0.1$, $(S+P)/C < 0.2$, $O > 3P$, $H < 2C+2$, $0 < C+2$, $DBE \geq 0$ の条件を満たす分子式を残した後、妥当と考えられる候補を一つ選択するという、「半自動化解析」を試みた。この結果、たとえば、Deep 培養細胞の液胞試料の場合、 $m/z < 500$ では検出ピークの 76%に相当する 452 のピークに対し、妥当と考えられる分子式を推定する

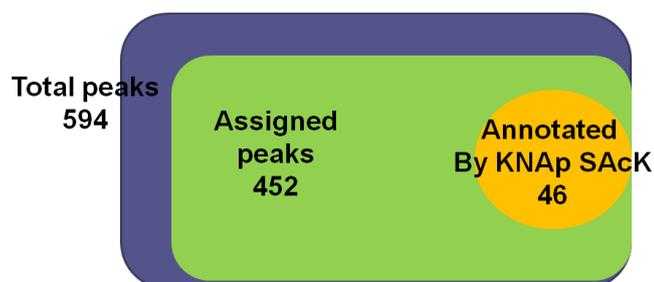


図 1 3 Deep 液胞試料中の検出および同定ピーク数

図 1 3 Deep 液胞試料中の検出および同定ピーク数

ことができた。m/z<500 の範囲で KNapSAck データベースにヒットした化合物 46 の分子式がこの方法により計算された予想分子式と一致し、この分子式予測法の妥当性が確認できた(図13)。

液胞試料と細胞試料中に検出され、予想分子式が KnapSAck データベースの検索結果と一致して、アノテーションがつけられた物質のリストを表2、表3に示す。表中で、ほとんどすべての物質は液胞と細胞の両方の試料中に検出された。物質の精査は必要ではあるが、現時点で他数の糖リン酸化合物が検出されているのは興味深い(表3)。KNapSAck データベースに載っていなかった化合物群については、未知物質であると考えられるので、分子式の予想法が妥当であるとの前提のもと、今後構造式や化合物グループの推定に取り組んでいく。

表2 Deep 液胞・細胞試料中に検出され、予想分子式と KnapSAck データベースサーチが一致した物質 (CHO 化合物)

m/z	Formula (CHO)	vacuole	cell	annotation
179.05606	C6H12O6	○	○	D-(+)-Galactose;D-Galactose;Galactose
195.05094	C6H12O7	○	○	D-Gluconate;Gluconic acid;D-Gluconic acid
191.01966	C6H8O7	○	○	Citric acid
209.06664	C7H14O7	○	○	alpha-D-Mannoheptulose
207.08736	C8H16O6	○	○	Ethyl beta-D-glucopyranoside;(-)-Ethyl beta-D-glucopyranoside
325.11412	C12H22O10	○	○	Neohesperidose
227.16524	C13H24O3	○	○	Sarmentol D
219.17533	C15H24O	○	○	(+)-Isovalencenol;Isovalencenol
235.17032	C15H24O2	○	○	Dihydrocapsenone;[3R-(3alpha,4alpha,4abeta,6beta,8abeta)]-Octahydro-3-hydroxy-4,4a-dimethyl-6-(1-methylethenyl)-1(2H)-naphthalenone
293.17582	C17H26O4	○	○	(S)-6-Gingerol;(S)-(+)-[6]Gingerol;[6]-Gingerol
395.19236	C17H32O10	○	○	Creoside IV
373.18684	C18H30O8	○	○	Rosiridoside
403.19722	C19H32O9	○	○	Staphylioside C;(-)-Staphylioside
437.20293	C19H34O11	○	○	Ebracteatoside D;(-)-Ebracteatoside D
415.19734	C20H32O9	○	○	6-Acetoxy-7-hydroxymyrcene-7-O-beta-D-glucopyranoside-2'-O-acetate
417.21303	C20H34O9	○	○	Maryal;(+)-Maryal
419.22864	C20H36O9	○	○	Staphylioside I;(-)-Staphylioside I
463.08846	C21H20O12	○	○	Bractein
465.23415	C21H38O11	○	○	Rhodiolioside E;Sachalioside VIII;(-)-Sachalioside VIII
369.30088	C22H42O4	○	○	1,22-Docosane dioic acid
413.19691	C24H30O6	○	○	Magnoshinin
455.26521	C24H40O8	○	○	Dendronpholide L;(-)-Dendronpholide

また、青木グループの LC-FT MS によりシロイヌナズナ植物体試料において、検出が確認されている数種のグルコシレート化合物を、Shoot 液胞・Shoot 細胞・Root 細胞抽出試料の FT-ICR MS により検出されたマスリストから検索したところ、1ppm 以内の誤差で検出されるものが多数見つかった(表4)。これは、液胞中にグルコシレート化合物を検出した初めての成果である。

表 3 Deep 液胞・細胞試料中に検出され、予想分子式と KnapSack データベースサーチが一致した物質 (CHONSP 化合物)

m/z	Formula	vacuole	cell	annotation
259.02239	C6H13O9P	○	○	D-Fructose 6-phosphate
221.04885	C8H14O5S	○	○	2-(3'-Methylthio)propylmalic acid
180.06659	C9H11NO3	○	○	L-Tyrosine
323.02858	C9H13N2O9P	○	○	UMP,Uridine 5'-phosphate
402.99498	C9H14N2O12P2	○	○	UDP,Uridine 5'-diphosphate
218.1033	C9H17NO5	○	○	Pantothenic acid
362.05067	C10H14N5O8P	○	○	GMP,Guanosine 5'-phosphate
212.07499	C10H15NO2S	○	○	N-Butylbenzenesulfonamide
203.08257	C11H12N2O2	○	○	Vasicinol
206.08229	C11H13NO3	○	○	Cantleyine
421.07529	C12H23O14P	○	○	alpha,alpha-Trehalose 6-phosphate
278.06696	C13H13NO6	○	○	N-(E-4-coumaroyl)-aspartate
354.10478	C13H25NO6S2	○	○	5-Methylthiopentylsulfoglucosinolate
308.07757	C14H15NO7	○	○	Isotan B
462.06684	C14H18N5O11P	○	○	Adenylosuccinate;Adenylosuccinic acid;Adenylosuccinic acid
264.1605	C15H23NO3	○	○	Ficuseptamine A
369.07267	C18H14N2O7	○	○	Kinamycin F
407.11714	C20H24O7S	○	○	Podolactone D
423.11203	C20H24O8S	○	○	Podolactone C
458.23968	C22H37NO9	○	○	Theopederin E
420.23924	C23H35NO6	○	○	(+)-N-(Dihydro-5'-hydroxy-6-oxospiro[4,8-dioxatricyclo[5.1.0.0.3,5]octane-2,2'(3'H)-furan]-4'-yl)-4,6-dimethyl-2-dodecenamide;EI 2128-1
422.25478	C23H37NO6	○	○	Dihydrogadesine
470.23959	C23H37NO9	○	○	Glucolanomycin
368.35327	C23H47NO2	○	○	Penazetidine A
443.16091	C26H24N2O5	×	○	Petromurin

表 4. Deep 細胞および液胞試料に見つかったグルコシノレート化合物

Theoretical m/z	Compound name	Molecular Formula	Detection		
			Shoot Vacuole	Shoot Cell	Root Cell
422.025482	3-Methylsulfinylpropyl glucosinolate	C11H21NO10S3	○	○	×
436.041132	4-Methylsulfinylbutyl glucosinolate	C12H23NO10S3	○	○	○
464.072432	6-Methylsulfinyl-n-hexyl-glucosinolate	C14H27NO10S3	×	○	×
478.088082	7-Methylsulfinyl-n-heptyl-glucosinolate	C15H29NO10S3	○	○	×
492.103732	8-Methylsulfinyloctyl glucosinolate	C16H31NO10S	○	○	○
422.025482	3-Methylsulfinyl-n-propyl-glucosinolate	C11H21NO10S3	○	○	×
450.056782	5-Methylsulfinyl-n-pentyl-glucosinolate	C13H25NO10S3	○	○	×

(2)研究成果の今後期待される効果

FT-ICR MS 分析は、現在のところ、他の質量分析に比してその分解能において比肩する方法のない分析法であり、この方法により検出されるピークの m/z 値を分子式の推定に用いることができる唯一の方法である。現在までに、本法により検出されたシロイヌナズナ液胞試料・T87 過剰発現体液胞試料・植物体試料中のピークのリスト化がされ、網羅的解析が進んでいるところであるが、網羅的に分子式を予測し、さらに予測された分子式に対して

データベースサーチなどの手法を用いて化合物名の同定に繋げることが可能である。また、液胞中に存在する未知の有機リン化合物やペプチド代謝物質などの同定にもつなげることができると考えられる。未知物質の同定は、すなわち、液胞の未知の機能を知ることである。

4. 4 超高分解能質量分析装置を用いた液胞代謝産物解析 (かずさ DNA 研究所 青木グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

1) シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株標準液胞代謝物のアノテーション

神戸大学三村グループより提供されたシロイヌナズナ培養細胞 Deep 株単離標準液胞抽出物を LC-FT-ICR/MS を用いて、ポジティブイオン ESI モード・ネガティブイオン ESI モードによる分析を行ない、個々の代謝物に由来するピークの推定(アノテーション)を完了した。ポジティブイオン ESI モードから 736 代謝物、ネガティブイオン ESI モードから 713 代謝物の存在が推定された。

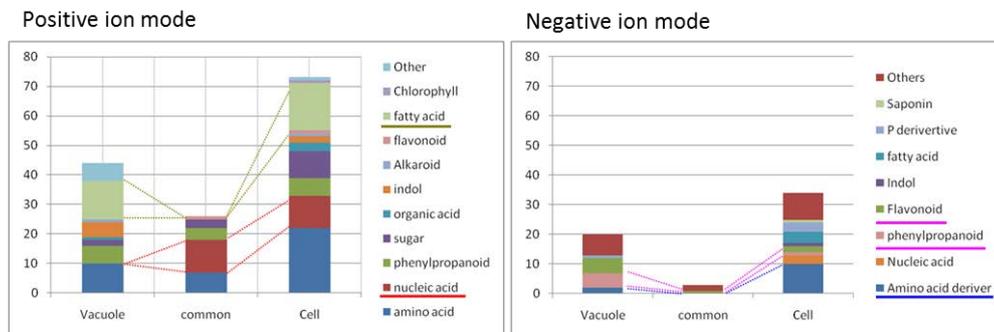


図 1 4. Deep 株由来標準液胞代謝物の包括的アノテーション。Deep 株全細胞代謝物組成との比較を行ない、アミノ酸・核酸の少ない液胞代謝物組成の特徴が示唆された。

検出代謝物の中で天然化合物データベースにヒットしたものは 10%程度であった。これら代謝物がいかなる化合物群に属するかを見たところ、全細胞に特異的な代謝物と単離標準液胞に特異的な代謝物の組成には明らかな差が認められた。液胞にはアミノ酸・核酸に属する代謝物数が少なかった(図14)。

現在、杉山グループによって、さらに詳細な代謝物数の特定が行われており、これによると液胞代謝物数はより少ない数字になる見込みである。

2) 液胞膜タンパク質形質転換培養細胞由来の単離液胞代謝物の解析

神戸大学三村グループによる液胞膜プロテオーム解析から数十種類の機能未知液胞膜タンパク質の存在が示唆された(Shimaoka et al., Plant Cell Physiol., 45:672-583, 2004)。液胞機能未知タンパク質の機能を系統的に解明していくために、本研究では機能未知トランスポーター遺伝子の2つのファミリーから一遺伝子ずつを選抜し解析対象とした。1つは MATE efflux family に属する At3g21690、もう1つは Sugar transporter-like family に属する At1g75220 である。

研究方法としては、これらの遺伝子 cDNA を活用して形質転換体を作製し、コントロール形質転換体との間で液胞代謝物組成を比較する方針をとった(図15)。

形質転換体作製に際して、シロイヌナズナ培養細胞系統の中でも形質転換法が確立されている T87 株を使用した。過剰発現体作製のためにはカリフラワーモザイクウイルス35S プロモーターを使用し完全長 cDNA を発現させた。サイレンシング体作製のためには、amiRNA または Inverted repeat 配列をカリフラワーモザイクウイルス35S プロモーターで発現させた。代謝物分析用のサンプルは液胞画分と全細胞画分両者を測定する必要性を考

慮し、液胞画分単離の可能な継代後5日目の細胞を用いた。

① At3g21690

MATE efflux family 形質転換体での代謝物組成変化

蓄積レベルの変動している代謝物を選抜するために、(i)空ベクターコントロール形質転換体に比べて2倍以上増/減している、(ii)全細胞画分からも検出される、(iii)三反復の測定で再現性がみられる、(iv)過剰発現システムとサイレンシングシステムで増減が反転する、という4つの基準を用いた。

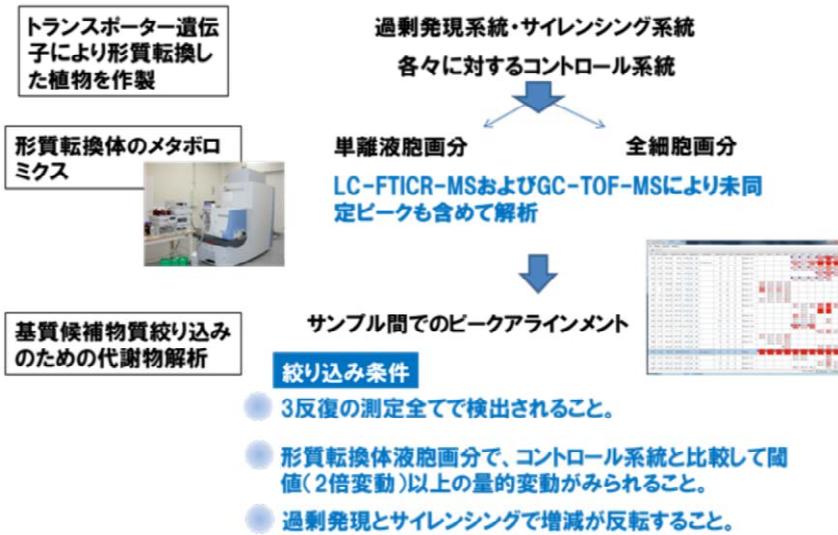


図15. 機能未知液胞膜トランスポーター遺伝子の機能探索の方針。トランスポーターの遺伝子を利用して形質転換体を作製し、その液胞中での代謝物変動を手掛かりとして、トランスポーターの輸送基質を絞り込む。

At3g21690 過剰発現形質転換体で LC-FT-MS により取得されたデータから上の基準を満たして液胞で増加しているピークを選抜を試みた。保持時間(RT)と質量電荷比(m/z)、正電荷イオンを p、負電荷イオンを n としてピークを表すこととすると、RT13.4m/z284.098_p は標品との比較により Guanosine と同定され、過剰発現システムの単離液胞・全細胞画分で増加し、サイレンシングシステムの全細胞画分で減少が見られた(図16)。しかしながら、サイレンシングシステムの単離液胞画分で 2.8 倍に増加していた。Guanosine は At3g21690 自体の基質ではなく、基質物質の輸送に伴って副次的に増減しているのかもしれない。

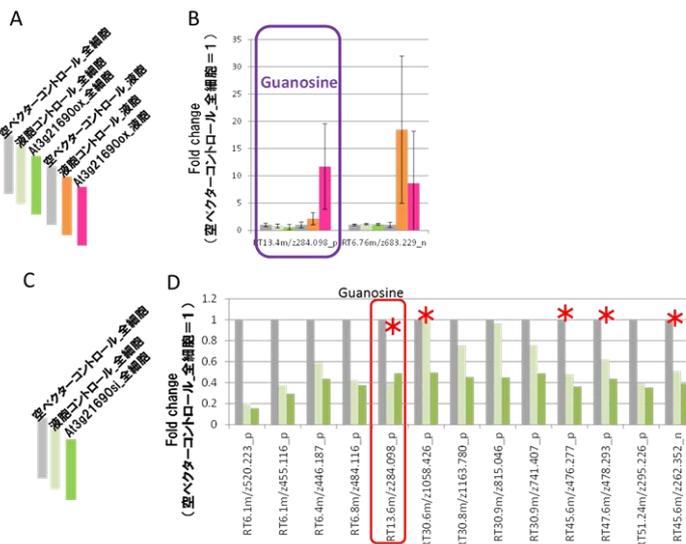


図16. At3g21690 過剰発現、サイレンシング T87 細胞の全細胞・単離液胞におけるグアノシンの量変動。(A) B のバーの凡例。(B) 過剰発現システムでのグアノシンの量変動。空ベクターコントロールを 1 とした。(C) D のバーの凡例。(D) サイレンシングシステムにおけるグアノシンの量変動。空ベクターコントロールを 1 とした。残念ながらサイレンシングシステム単離液胞において、グアノシンは 2.8 倍に増加していた。

さらに At3g21690 基質候補と思われる代謝物を見出すために、ノンターゲットに基準を満たす代謝物を選定した(図17)。

At3g21690 過剰発現で増加し、サイレンシングで減少する液胞内代謝物

RT	m/z	ion	Cell Fr.	FC in ox	FC in si
16.11	210.076	[M+H] ⁺	Yes	2.33	0.50
16.06	208.061	[M-H] ⁻	Yes	2.39	0
30.58	565.186	[M-H] ⁻	Yes	∞	0.30
30.34	567.211	[M-H] ⁻	Yes	2.18	0

At3g21690 過剰発現で減少し、サイレンシングで増加する液胞内代謝物

RT	m/z	ion	Cell Fr.	FC in ox	FC in si
6.59	729.162	[M-H] ⁻	Yes	0	∞
6.74	731.227	[M-H] ⁻	Yes	0	∞
11.78	235.046	[M-H] ⁻	Yes	0	∞

図 17. At3g21690 過剰発現、サイレンシング T87 細胞の全細胞・単離液胞において、選定基準を満たす代謝物ピーク。赤字で示した 2 つのピークは、同じ代謝物がポジティブ、ネガティブ両イオンモードで検出されているものである。これらのピークに対応する代謝物名は見同定である。

単離液胞において過剰発現系統で増加しサイレンシング系統で減少する、すなわち液胞に搬入される基質と思われるピークが4つ、過剰発現系統で減少しサイレンシング系統で増加する、すなわち液胞から搬出される基質と思われるピークが 3 つ検出された。代謝物名は未同定である。

LC-FT-MS と並行して GC-TOF-MS を用いた分析により、一次代謝物の中で At3g21690 の機能との関係が示唆されるものの選定を試みた。At3g21690 過剰発現 T87 細胞液胞中では Glutathione と L-Threonate が選定基準を満たす増加を示した(図18)。ただしサイレンシング単離液胞画分の GC-TOF-MS 分析は実施しなかった。

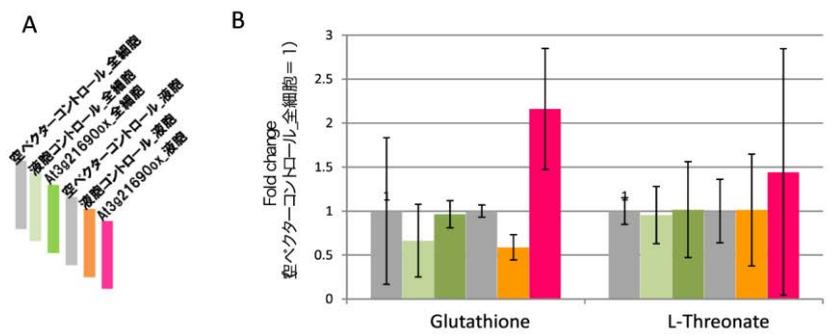


図 18. At3g21690 過剰発現 T87 細胞の液胞にて蓄積量増加が認められる一次代謝物。(A) グラフのバーの凡例。(B) 選定されたピーク。

② At1g75220 Sugar transporter-like 形質転換体での代謝物組成変化

At3g21690 形質転換体の場合とまったく同じ判定基準を用いて、At1g75220 過剰発現形質転換体で LC-FT-MS により取得されたデータから液胞で増加しているピークの選抜を試みた。過剰発現液胞中では RT5.80m/z1139.65_p、RT30.4m/z523.217_p、RT30.5m/z699.279_p、RT30.5m/z1058.42_p、RT30.5m/z503.190_p、RT30.5m/z538.228_p

などに増加がみられた(図19)。

At1g75220 過剰発現で増加し、サイレンシングで減少する液胞内代謝物

RT	m/z	ion	Cell Fr.	FC in ox	FC in si
15.99	557.172	[M-H] ⁻	Yes	2.13	0

At1g75220 過剰発現で減少し、サイレンシングで増加する液胞内代謝物

RT	m/z	ion	Cell Fr.	FC in ox	FC in si
10.79	332.133	[M+H] ⁺	Yes	0.45	2.34 Ambellinell
36.69	300.088	[M-H] ⁻	Yes	0.41	2.03 N-acetyl- α -D-glucosamine 1-phosphate
6.79	447.137	[M-H] ⁻	Yes	0	10.14 Que 3-rha
6.92	521.175	[M-H] ⁻	Yes	0	2.98
6.76	536.167	[M-H] ⁻	Yes	0	3.47
6.75	878.289	[M-H] ⁻	Yes	0	3.00 UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate

図19. At1g75220 過剰発現およびサイレンシング T87 細胞の全細胞・単離液胞において、選定基準を満たす代謝物ピーク。

一部のピークに対して化合物名を対応付けることが可能であった。特に RT36.96min, m/z300.088 [M-H]⁻, N-acetyl- α -D-glucosamine 1-phosphate は、他の植物の液胞や、本単離液胞サンプルの CE-MS 分析においても検出されている。

LC-FT-MS と並行して GC-TOF-MS を用いた分析により、一次代謝物の中で At1g75220 の機能との関係が示唆されるものの選定を試みた。At1g75220 過剰発現 T87 細胞液胞中では gamma-aminobutyrate(GABA)が選定基準を満たす増加を示した(図20A, B)。また Sucrose と myo-inositol はむしろ過剰発現系統の全細胞画分で増加する傾向を示した。(図20C)。

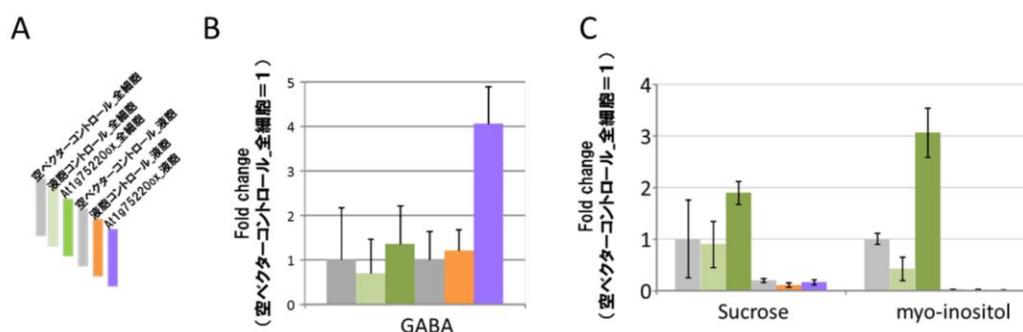


図20. At1g75220 過剰発現 T87 細胞の液胞にて蓄積量増加が認められる一次代謝物。(A) グラフのバーの凡例。(B) GABA が単離液胞画分で増加していた。(C) シュークローズとミオイノシトールは全細胞画分で増加が見られた。

3) 液胞膜タンパク質形質転換植物体での代謝物の解析

シロイヌナズナ培養細胞 T87 における代謝物組成は、シロイヌナズナ植物体の代謝物組成とは異なるため、培養細胞の代謝物解析だけでは機能未知トランスポーターの基質候補代謝物を見落とす可能性がある。そこで、培養細胞を形質転換したものと同じコンストラクトを用いて、シロイヌナズナ形質転換植物体も作製し、代謝物変動の解析を試みた。

① At3g21690 MATE efflux family 形質転換植物体での代謝物組成変化
 At3g21690 過剰発現シロイヌナズナロゼット葉(21日目)において、RT44.5m/z467.189_p、RT21.4m/z211.145_p、RT6.91m/z267.036_n、RT7.09m/z383.047_n など未知代謝物とともに、グルコシノレート類が増加していた(図21)。シロイヌナズナ葉で量的に多いメチオニン由来グルコシノレートは 4-methylsulfinylbutyl glucosinolate だが、At3g21690 過剰発現体では比較的側鎖の長い 6-methylsulfinylhexyl glucosinolate、7-methylsulfinylheptyl glucosinolate、8-methylsulfinyloctyl glucosinolate などの Fold Change が大きかった。イソチオシアネートの Fold change も大きいですが、これらは抽出の際に対応するグルコシノレートが加水分解を受けたものだと推定される。

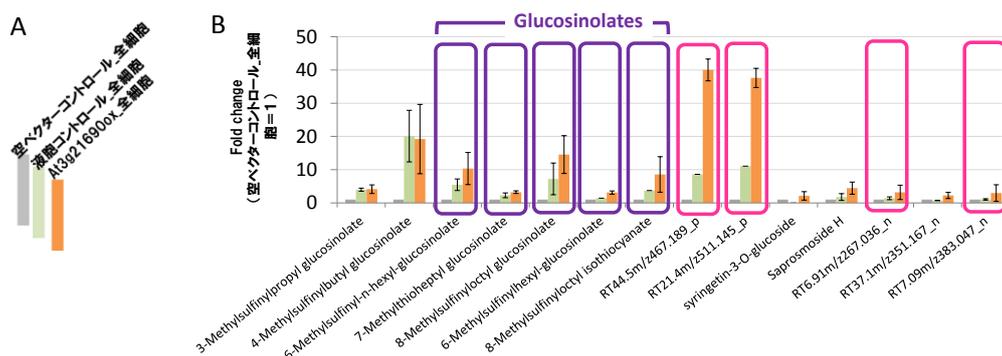


図 21. At3g21690 サイレンシングシロイヌナズナ植物体・葉の全細胞画分におけるグルコシノレート類の蓄積量減少。(A) グラフのバー凡例。(B) 空ベクターコントロールでのレベルを 1 とした時のグルコシノレート類の蓄積レベル。どれも減少しているが、液胞膜の他のタンパク質をサイレンシングしたコントロールでも減少している。

逆に At3g21690 発現をサイレンシングにより抑制した植物体では、グルコシノレート類が減少する傾向がみられた(図22)。この時、液胞膜コントロールとした形質転換体でもグルコシノレート類が一様に減少していることから、この現象が At3g21690 サイレンシングに特異的だとは結論付けられない結果となった。また、過剰発現体で増加がみられた他の未同定代謝物に減少は見られなかった。

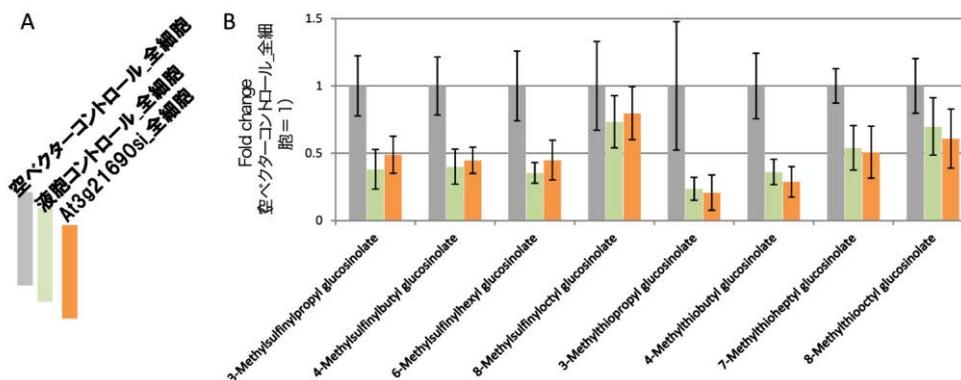


図 22. At3g21690 過剰発現シロイヌナズナ植物体・葉の全細胞画分において蓄積量増加が認められる代謝物。(A) グラフのバー凡例。(B) 評価基準に従って判定した時に過剰発現によって蓄積量が増加したと推定される代謝物。空ベクターコントロールでのレベルを 1 とした。

② At1g75220 Sugar transporter-like 形質転換植物体での代謝物組成変化

同様に At1g75220 過剰発現植物体・葉で増加している代謝物を探索した。RT49.8m/z1018.596_p、RT6.9m/z745.140_p の2つの未同定ピークが、過剰発現形質転換体で増加し、サイレンシング形質転換体で逆に減少する傾向を示した(図23)。いずれも培養細胞単離液胞に検出されたピークとは一致しなかったが、これは培養細胞と植物体の代謝組成の違いを反映している可能性が大きい。

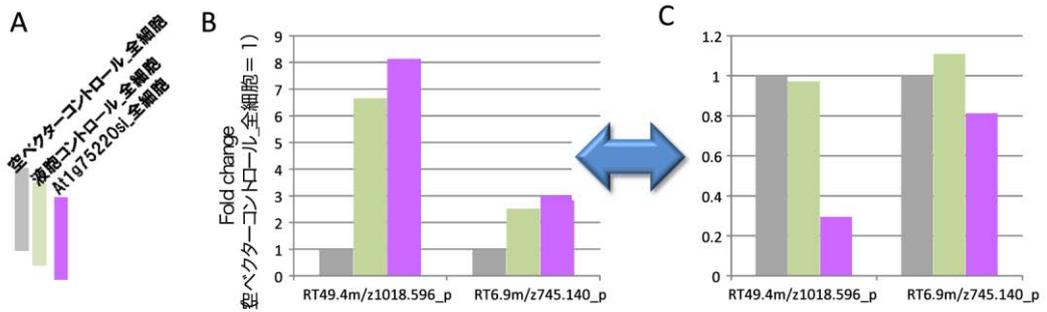


図 23. At1g75220 過剰発現ならびにサイレンシングシロイヌナズナ植物体・葉の全細胞画分における代謝物蓄積変動。(A) グラフのバー凡例。(B) 過剰発現 (C) サイレンシング、それぞれの形質転換体葉での未同定代謝物 RT49.4m/z1018.596_p と RT6.9m/z745.140_p の蓄積変化。過剰発現体で増加し、サイレンシングで減少する傾向を示した。

4) 液胞膜タンパク質形質転換培養細胞でのトランスクリプトーム解析

At3g21690 および At1g75220 過剰発現形質転換 T87 系統を用いてトランスクリプトーム解析を実施した。液胞膜トランスポーター遺伝子の発現を変えることにより、遺伝子発現が広範な変動を被るかどうかを調査した。トランスクリプトーム解析にはアフィメトリクスマイクロアレイ・ATH1 を使用し、遺伝子発現データを統合オミクスツール・KaPPA View を用いて代謝経路へマッピングすることで、代謝変化と遺伝子変化を関連付ける方針をとった。

これらの液胞膜トランスポーター遺伝子の過剰発現によって、意外にも数多くの代謝経路遺伝子が発現変化を被っていたが、代謝物変動と遺伝子発現変化は必ずしもリンクしていないようであった。例えば、At3g21690 過剰発現により液胞で増加の傾向がみられたグルタチオンの生合成にかかわる酵素遺伝子に大きな変化は見られなかった。グルタチオンの増加は生合成とは関連が薄く、細胞内代謝物輸送により制御されていることが示唆される(図24A)。At1g75220 の過剰発現は GABA の液胞蓄積量を増加させるが、この形質転換体ではグルタミン酸・グルタミン代謝系のいくつかの遺伝子がアップレギュレートされていた(図24B)。今後、より多くの代謝物を代謝経路にマップすることで、非代謝酵素遺伝子の発現変化が遺伝子発現に及ぼす影響が見えてくると思われる。

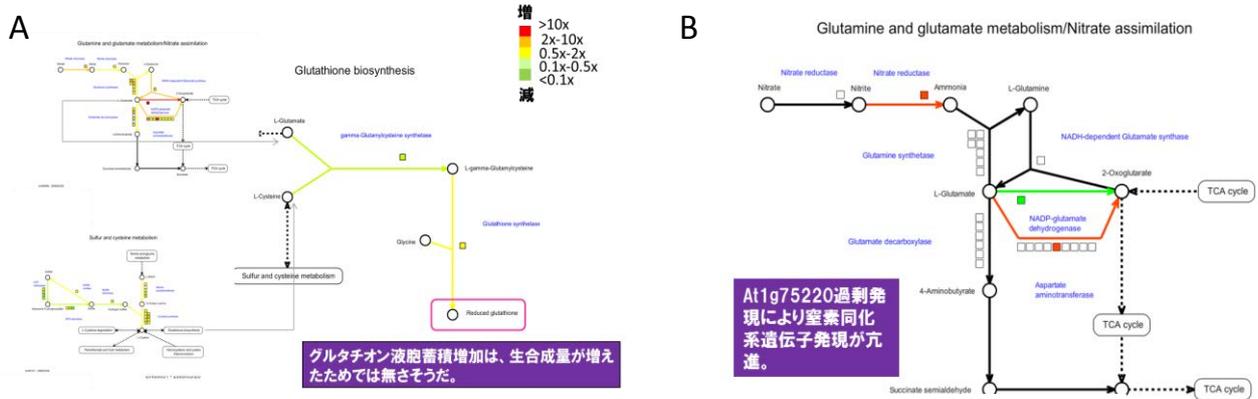


図 24. (A) At3g21690 過剰発現 T87 細胞でのグルタチオン代謝経路遺伝子の発現変化。アミノ酸代謝経路を含めて、大きな変化は見られず、代謝物変化は生合成活性の変化に依存していないことを示唆。(B) At1g75220 過剰発現 T87 細胞でのグルタミン酸・グルタミン生合成経路の遺伝子発現変化。正に制御されている。

その端緒を開く解析として、At1g75220 過剰発現 T87 と At3g21690 過剰発現 T87 における遺伝子発現の程度を、コントロール系統に対する Fold Change (FC) ベースで比較した。すると有意な正の相関がみられた(図25)。ランダムに選んだ遺伝子の過剰発現はこのような相関を示さないことは確認している。2つの液胞膜トランスポーター遺伝子の過剰発現は、細胞に対して何らかの共通した変動要因あるいはストレスを与えていることが予想される。

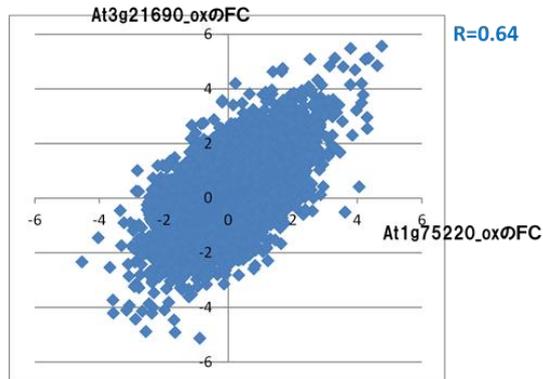


図 25. At1g75220 過剰発現系統と At3g21690 過剰発現系統の間での遺伝子発現変動の程度相関。正の相関がみられる。すなわち、片方の過剰発現系統で増加している遺伝子は、もう一方でも増加している傾向にある。

2)研究成果の今後期待される効果

液胞膜トランスポーターの輸送基質を明らかにしていくことにより、輸送と貯蔵という観点から細胞内での代謝物の蓄積量制御に対して新しい方策を提供することになると思われる。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 14 件)

1. Ohnishi M., Mimura T., Tsujimura T., Mitsunashi M., Washitani-Nemoto S., Maeshima M., Martinoia E. (2007) Inorganic phosphate uptake in intact vacuoles isolated from suspension cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don under varying Pi status. *Planta* 225(3):711-718
2. Luo J., Nishiyama Y., Fuell C., Taguchi G., Elliott K., Hill L., Tanaka Y., Kitayama M., Yamazaki M., Bailey P., Parr A., Michael A.J., Saito K., Martin C. (2007) Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases; identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 50 (4): 678–695
3. Sirikantaramas S., Sudo H., Asano T., Yamazaki M., Saito K. (2007) Transport of camptothecin in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Phytochemistry*, 68: 2881-2886
4. Mitsunashi N., Kondo M., Nakaune S., Ohnishi M., Hayashi M., Hara-Nishimura I., Richardson A., Fukaki H., Nishimura M., Mimura T. (2008) Localization of myo-inositol-1-phosphate synthase to the endosperm in developing seeds of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 59: 3069-3076.
5. Wangwattana B., Koyama Y., Nishiyama Y., Kitayama M., Yamazaki M., Saito K. (2008) Characterization of *PAP1*-upregulated glutathione *S*-transferase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotech.*, 25, 191-196.
6. Yamazaki M., Shibata M., Nishiyama Y., Springob K., Kitayama M., Shimada N., Aoki T., Ayabe S., Saito K. (2008) Differential gene expression profiles of red and green forms of *Perilla frutescens* leading to comprehensive identification of anthocyanin biosynthetic genes. *FEBS J.*, 275, 3494-3502.
7. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M-H, Terao-Morita M., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T. (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 50 (12) : 2023-2033. doi:10.1093/pcp/pcp143
8. Nakabayashi R., Kusano M., Kobayashi M., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Kogure N.,

- Yamazaki M., Kitajima M., Saito K. and Takayama H. (2009) Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two new anthocyanins from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, 70, 1017-1029 doi:10.1016/j.phytochem.2009.03.021
9. Nakabayashi R., Yamazaki M., Saito K. (2010) A polyhedral approach for understanding flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *New Biotechnology*, 27, 829-836
 10. Yamazaki M., Asano T., Yamazaki Y., Sirikantaramas S., Sudo H. and Saito K. (2010) Biosynthetic system of camptothecin: an anticancer plant product. *Pure Appl. Chem.*, 82, 213-218
 11. Bunsupa S., Okada T., Saito K. and Yamazaki M. (2011) An acyltransferase-like gene obtained by differential gene expression profiles of quinolizidine alkaloid-producing and nonproducing cultivars of *Lupinus angustifolius*. *Plant Biotechnology*, 28, 89-94
 12. Viraporn V., Yamazaki M., Saito K., Denduangboripant K. J., Chayamarit K., Chuanasa K., Sukrong S. (2011) Correlation of Camptothecin-producing Ability and Phylogenetic Relationship in the Genus *Ophiorrhiza*. *Planta Medica*, 77, 759-764
 13. Oikawa A., Matsuda F., Kikuyama M., Mimura T., Saito K. (2011) Metabolomics of a single vacuole reveals metabolic dynamism in an alga *Chara australis*. *Plant Physiology* 157(2), 544-551, DOI:10.1104/pp.111.183772
 14. Bunsupa S., Katayama K., Ikeura E., Oikawa A., Toyooka K., Saito K., Yamazaki M. (2012) Lysine Decarboxylase Catalyzes the First Step of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis and Coevolved with Alkaloid Production in Leguminosae. *Plant Cell*, 24, 1202-1216

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Sirikantaramas S., Asano T., Sudo H., Yamazaki M. and Saito K. (2007) Camptothecin: Therapeutic potential and biotechnology. *Curr. Pharm. Biotech.*, 8, 196-202
2. Mimura T., Ohnishi M., Shimaoka T., Tomizawa K. (2008) Proteome analysis of vacuolar membrane. In "Plant Genetic Engineering vol 9: Plant membrane and vacuolar transporters", Ed. by Jaiwal PK. pp. 301-343, CABInternational
3. Yonekura-Sakakibara K., Nakayama T., Yamazaki M., Saito K. (2008) Modification and Stabilization of Anthocyanins. in "Anthocyanins-Biosynthesis, Functions, and Applications" K. Gould, K. Davis, C. Winefield eds. pp. 169-190, Springer
4. 三村 徹郎 (2009)「基礎生物学シリーズ7 植物生理学」(三村徹郎、鶴見誠二 編) 化学同人
5. 三村 徹郎 村上 明男 (2009)「水環境の今と未来 藻類と植物のできること」(川井浩史、三村徹郎 編) 生物研究社 「3. 水生植物の生理 35-50 ページ」
6. Asano T., Sudo H., Yamazaki M., Saito K. (2009) Camptothecin production by in vitro cultures and plant regeneration in *Ophiorrhiza* species. In "Methods in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants", vol. 547, pp.337-2435, Humana Press
7. Sirikantaramas S., Yamazaki M., Saito K. (2009) A survival strategy: The coevolution of the camptothecin biosynthetic pathway and self-resistance mechanism. *Phytochemistry*, vol.70 1894-1898
8. 西村幹夫・三村徹郎・西村いくこ・真野昌二 監修、永野惇・桧垣匠 文(2010)「Photobook 植物細胞の知られざる世界」化学同人
9. 杉山裕子. (2010) 近年の腐植物質分析法の展開 5. サイクロトン質量分析. 日本土壤肥料学雑誌, 81(2): 168~173.
10. Yamazaki M. and Saito K. (2011) Molecular genetic study on the anthocyanin chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Natural Product Communications*, 6, 423-428

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

- ① 招待講演 (国内会議 16 件、国際会議 8 件)

〈国内会議〉

1. 三村徹郎¹、三橋尚登¹、Alan Richardson²、Sung-Kee Chung³、八木澤仁⁴(¹神戸大院理、²CSIRO、³POSTEC、⁴兵庫県立大院生命)：イノシトールリン酸の網羅的測定と、植物における生理機能。第31回日本神経科学大会（東京 平成20年7月9-11日）
2. 山崎真巳¹、シリカンタラマス・スパアツ¹、斉藤和季¹（¹千葉大院薬）：植物におけるトポイソメラーゼII阻害剤カンプトテシンの生産と自己耐性の適応進化。日本薬学会第129年会（京都 平成21年3月26-28日）
3. 山崎真巳（千葉大院薬）：漢方方剤に関するメタボロミクスとデータマイニング、第27回日本植物細胞分子生物学会シンポジウム「メタボロミクス：植物機能ゲノミクスとバイオテクノロジーにおける役割」[オーガナイザー：鈴木秀幸（かずさDNA研）、平井優美（理研PSC）]（藤沢 平成21年7月30日）
4. 三村徹郎（神戸大院理）：液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム（東京 平成21年10月16日）
5. 三村徹郎（神戸大院理）：植物液胞のポストゲノム解析、第4回メタボロームシンポジウム（横浜 平成21年11月19日）
6. 杉山裕子（兵庫県立大環境人間）：水圏に溶存する有機物の蛍光スペクトル分析と質量分析によるキャラクタリゼーション、第38回環境分析技術協議会特別講演会（大阪 平成21年11月30日）
7. 三村徹郎¹、姉川彩¹、大西美輪¹（¹神戸大院理）：ポストゲノム解析から見えてきた植物細胞代謝における新しい液胞像、植物化学シンポジウム（神戸 平成21年12月17日）
8. 杉山裕子（兵庫県立大環境人間）：FT-ICRMSを用いた河川水・湖水中有機物のキャラクタリゼーション、第12回 東京大学工学系研究科附属水環境制御研究センターシンポジウム（東京 平成22年2月23日）
9. 大西美輪¹、吉田勝久¹、三村徹郎¹（¹神戸大院理）：プロテオミクスによる液胞機能の解析、「植物科学におけるプロテオミクス」、第51回日本植物生理学会年会（熊本 平成22年3月18-21日）
10. 三村徹郎（神戸大院理）：植物体内におけるリンの取り込み、分配、蓄積の生理学、「植物はどうやってリンを見つけて、運んで、利用するか」、第51回日本植物生理学会年会（熊本 平成22年3月18-21日）
11. 大西美輪（神戸大院理）：メタボロミクスによる植物液胞の機能解析、第5回メタボロームシンポジウム（鶴岡 平成22年9月9-11日）
12. 山崎真巳（千葉大院薬）：二次代謝による生体防御成分の生産ーメタボロミクスの応用展開の可能性ー。園芸学会平成22年度秋季大会公開シンポジウム「園芸植物の品質特性（色、香り、生体防御）の代謝生理」（大分 平成22年9月19-20日）
13. 山崎真巳（千葉大院薬）：薬用成分の生合成制御に関するゲノム機能科学的研究。日本生薬学会第57回年会徳島2010、学術貢献賞受賞講演（徳島 平成22年9月24-26日）
14. 山崎真巳（千葉大院薬）：漢方方剤のメタボロミクスとデータマイニング。第18回天然薬物の開発と応用シンポジウム「薬学における生薬・漢方の未来を考える」（東京 平成22年11月11-12日）
15. 山崎真巳（千葉大院薬）：アカジソとアオジソにおけるアントシアニン生産制御メカニズム研究。植物色素研究会第22回集会（福岡、平成22年11月27-28日）
16. 三村徹郎（神戸大院理）：液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第3回公開シンポジウム（東京 平成23年11月1日）

〈国際会議〉

1. Saito K.¹, Sirikanataramas S.¹, Sudo H.¹, Asano T.¹, Yamazaki M.¹ (千葉大院薬) : Biosynthetic system of camptothecin, an anticancer alkaloid - Pathway elucidation, gene discovery and self-resistance. Plant Secondary Metabolism and Metabolomics Workshop. Institute of Chinese Academy of Sciences. (June 6, 2008, Beijing, China)
2. Yamazaki M.¹, Sirikanataramas S.¹, Saito K.¹ (千葉大院薬) : Coevolution and parallel evolution of camptothecin production and self-resistance in plants. 7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products. (June 22-27, 2008, La Jolla, California, USA)
3. Mimura T.¹, Ohnishi M.¹, Anegawa A.¹, Oikawa A.², Harada K.³, Fukusaki E.³, Sugiyama Y.^{4,4}, Yamazaki M.⁵, Aoki K.⁶ (神戸大院理、²理研PSC、³大阪大院工、⁴兵庫県立大環境人間、⁵千葉大院薬、⁶かずさDNA研) : Post genome analysis of vacuolar function and control of plant metabolism. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
4. Yamazaki M.¹, Asano T.¹, Okuyama J.¹, Sirikanataramas S.¹, Sudo H.¹, Saito K.¹ (千葉大院薬) : Biosynthetic system of camptothecin an anticancer plant product. The 13th International Biotechnology Symposium and Exhibition. (October 12-17, 2008, Dalian, China)
5. Yamazaki M. (千葉大院薬) : Regulation of anthocyanin production in *Perilla frutescens*. 5th International Workshop on Anthocyanins (September 15-18, 2009, Nagoya Japan)
6. Yamazaki M.¹, Asano T.¹, Kashihara E.¹, Kobayashi K.¹, Aoki K.², Sasaki R.², Iijima N.², Saito K.¹ (千葉大院薬、²かずさDNA研) : RNA silencing and pathway mining of camptothecin production in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. The 1st Current Drug Development International Conference (May 6-8, 2010, Phuket, Thailand)
7. Mimura T.¹, Hirai M.², Yanagisawa S.³ (神戸大院理、²理研 PSC、³東京大院農) : Metabolome researches in plant metabolic regulation. 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 – 10, 2010, Yokohama Japan)
8. Yamazaki M.¹, Asano T.¹, Aoki K.², Saito K.¹ (千葉大院薬、²かずさ DNA 研) : Elucidation of biosynthetic pathway of camptothecin by metabolomics. Phytochemical Society of North America 50th Anniversary Meeting, Hawaii, December 10-15, 2011

② 口頭発表 (国内会議 44 件、国際会議 1 件)

〈国内会議〉

1. 奥山淳¹、浅野孝¹、Sirikanataramas Supaart¹、斉藤和季¹、山崎真巳¹ (千葉大院薬) : カンプトテシンを生産するチャボイナモリ毛状根に特異的に発現する転写因子について。第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム(千葉 平成 19 年 8 月 8-9 日)
2. 林香代子¹、浅野孝¹、Sirikanataramas Supaart¹、斉藤和季¹、山崎真巳¹ (千葉大院薬) : カンプトテシンを生産するチャボイナモリ毛状根に特異的に発現する P450 遺伝子について。第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム(千葉 平成 19 年 8 月 8-9 日)
3. Bunsupa S.¹, Ikeura E.¹, Saito K.¹ and Yamazaki M.¹ (千葉大院薬) : Molecular cloning and characterization of genes specifically expressed in alkaloid-producing cultivar of *Lupinus angustifolius*. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム(千葉 平成 19 年 8 月 8-9 日)
4. Wangwattana B¹., Koyama Y¹., Nishiyama Y¹., Saito K¹. and Yamazaki M¹. (千葉大院薬) : Characterization of PAP1-upregulated glutathione S-transferase genes in *Arabidopsis thaliana*. 第 25 回日本植物細胞分子生物学会千葉大会・シンポジウム(千葉 平成 19 年 8 月 8-9 日)
5. 大西美輪¹、原田和生²、及川彰³、姉川彩¹、七條千津子¹、深城英弘¹、杉山裕子⁴、Patrick G. Hatcher⁵、福崎英一郎⁶、三村徹郎¹ (神戸大院理、²大阪大院工、³理研 PSC、⁴兵庫県立大環境人間) : 植物細胞インタクト液胞を用いたメタボローム解析 日本植物

- 生理学会第49会年会(札幌 平成20年3月20-22日)
6. 及川彰¹、三村徹郎²(¹理研PSC、²神戸大院理)、齊藤和季: シャジクモ液胞のメタボローム解析 日本植物生理学会第49会年会(札幌 平成20年3月20-22日)
 7. 山崎真巳¹、奥山淳¹、林 香代子¹、浅野孝¹、Sirikantaramas Supaart¹、齊藤和季¹(¹千葉大院薬): チャボイナモリにおけるカンプトテシン生産制御に関与する遺伝子の探索と機能解析. 第49回日本植物生理学会年会(札幌 平成20年3月20-22日)
 8. 及川彰¹、三村徹郎²、齊藤和季¹(¹理研PSC、²神戸大院理): CE-MSを用いたシャジクモ液胞内化合物の解析. 日本植物細胞分子生物学会第26回大会(大阪 平成20年9月1-2日)
 9. 中林亮¹、榎原圭子²、松田史生²、北島満里子¹、高山廣光¹、山崎真巳¹、齊藤和季^{1,2}(¹千葉大院薬、²理研PSC): 二つのMYB遺伝子の同時過剰発現体におけるトランスクリプトームとフラボノイドプロファイル. 第26回日本植物細胞分子生物学会大阪大会・シンポジウム(大阪 平成20年9月1-2日)
 10. 浅野孝¹、奥山淳¹、千田かおり¹、齊藤和季¹、山崎真巳¹(¹千葉大院薬): チャボイナモリにおける毛状根特異的発現転写因子ERFによる遺伝子発現変動の網羅解析. 第26回日本植物細胞分子生物学会大阪大会・シンポジウム(大阪 平成20年9月1-2日)
 11. 大西美輪¹、原田和生²、及川彰³、姉川彩¹、七條千津子¹、深城英弘¹、杉山裕子⁴、Patrick G. Hatcher⁵、福崎英一郎²、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研PSC、⁴兵庫県立大環境人間、⁵Old Dominion Univ.): 植物インタクト液胞のポストゲノム解析. 日本植物学会第72回大会(高知 平成20年9月25-27日)
 12. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、小菅桂子¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理): キャピラリー電気泳動-質量分析装置を用いた植物生理活性物質の分析. 日本植物学会第72回大会(高知 平成20年9月25-27日)
 13. 大西美輪¹、原田和生²、及川彰³、姉川彩¹、小田祥久⁴、中山泰宗²、七條千津子¹、深城英弘¹、杉山裕子⁵、Patrick G. Hatcher⁶、福崎英一郎²、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研PSC、⁴東京大院理、⁵兵庫県立大環境人間、⁶Old Dominion Univ.): 植物インタクト液胞のポストゲノム解析. 第50回日本植物生理学会年会(名古屋 平成21年3月21-24日)
 14. 佐々木亮介¹、大西美輪²、姉川彩²、杉山裕子³、飯島陽子¹、櫻井望¹、柴田大輔¹、三村徹郎²、青木考¹(¹かずさDNA研、²神戸大院理、³兵庫県立大環境人間): シロイヌナズナ単離液胞代謝物のLC-FTICR-MS分析データに基づく包括的アノテーション. 第50回日本植物生理学会年会(名古屋 平成21年3月21-24日)
 15. 及川彰¹、松田史生¹、三村徹郎²、齊藤和季^{1,3}(¹理研PSC、²神戸大院理、³千葉大院薬): 単一細胞・単一液胞メタボロミクス. 第50回日本植物生理学会年会(名古屋 平成21年3月21-24日)
 16. 榎原圭子¹、井上恵理¹、松田史生¹、Bunyapa Wangwattana²、山崎真巳²、齊藤和季^{1,2}(¹理研PSC、²千葉大院薬): 遺伝子共発現解析によるシロイヌナズナ・アントシアニン糖転移酵素遺伝子の機能同定. 第50回日本植物生理学会年会(名古屋 平成21年3月21-24日)
 17. 中林亮¹、榎原圭子²、松田史生²、峠隆之²、北島満里子¹、高山廣光¹、山崎真巳¹、齊藤和季^{1,2}(¹千葉大院薬、²理研PSC): 二つのフラボノイド関連MYB遺伝子の同時過剰発現における効果. 日本薬学会第129年会(京都 平成21年3月26-28日)
 18. 及川彰¹、松田史生¹、三村徹郎(神戸大院理)²、齊藤和季^{1,3}(¹理研PSC、²神戸大院理、³千葉大院薬): 単一オルガネラメタボロミクスによる単一細胞内の代謝変動解析. 第27回日本植物細胞分子生物学会大会(藤沢 平成21年7月30-31日)
 19. 尾崎崇一¹、尾形善之¹、須田邦裕¹、鈴木達哉¹、倉林篤史¹、飯島陽子¹、柴田大輔¹、青木考¹(¹かずさDNA研): トマト代謝制御関連遺伝子によるフラボノイド経路の調節. 第27回日本植物細胞分子生物学会(藤沢 平成21年7月30-31日)

20. 小林可菜英¹、浅野孝¹、佐々木亮介²、飯島陽子²、青木考²、柴田大輔²、斉藤和季^{1,3}、山崎真巳¹ (¹千葉大院薬、²かずさDNA研、³理研PSC):TDCi毛状根の代謝物変動解析に基づくカンプトテシン生合成中間体の探索、第27回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(藤沢 平成21年7月30-31日)
21. 柏原恵美¹、浅野孝¹、千田かおり¹、佐々木亮介²、飯島陽子²、青木考²、柴田大輔²、斉藤和季^{1,3}、山崎真巳¹ (¹千葉大院薬、²かずさDNA研、³理研PSC):SLS遺伝子の発現を抑制したチャボイナモリ毛状根における代謝物変動. 第27回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(藤沢 平成21年7月30-31日)
22. 片山賀恵¹、Bunsupa S.¹、斉藤和季^{1,2}、山崎真巳¹ (¹千葉大院薬、²理研PSC):キノリチジンアルカロイド生合成に関与するリジン脱炭酸酵素の種間比較. 第27回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(藤沢 平成21年7月30-31日)
23. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹ (¹神戸大院理):キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いた植物生理活性物質の分析、日本植物学会第73回大会(山形 平成21年9月18-20日)
24. 大西美輪¹、姉川彩¹、佐々木亮介²、七條千津子¹、Enrico Martinoia³、深城英弘¹、青木考²、三村徹郎¹ (¹神戸大院理、²かずさDNA研、³Zurich Univ.):液胞膜エンジニアリングによる液胞代謝動態の解析、日本植物学会第73回大会(山形 平成21年9月18-20日)
25. 山崎真巳¹、浅野孝¹、柏原恵美¹、小林可菜英¹、佐々木亮介²、飯島陽子²、青木考²、柴田大輔²、斉藤和季^{1,3} (¹千葉大院薬、²かずさDNA研、³理研PSC):RNAサイレンシングとメタボローム解析によるカンプトテシン生合成のパスウェイマイニング、第4回メタボロームシンポジウム(横浜 平成21年11月18-19日)
26. 及川彰¹、松田史生¹、菊山宗弘²、三村徹郎³、斉藤和季^{1,4} (¹理研PSC、²新潟大理、³神戸大院理、⁴千葉大院薬):単一オルガネラメタボロミクスによる単一細胞内の代謝変動解析、ワークショップ:メタボロミクスが解き明かす代謝生物学 第32回日本分子生物学会年会(横浜 平成21年12月9日)
27. 山崎真巳¹、浅野孝¹、柏原恵美¹、小林可菜英¹、佐々木亮介²、飯島陽子²、青木考²、柴田大輔²、斉藤和季^{1,3} (¹千葉大院薬、²かずさDNA研、³理研PSC):カンプトテシン生合成における遺伝子抑制とメタボローム変動解析. 第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
28. 中林亮¹、榊原圭子²、松田史生²、峠隆之²、北島満里子¹、高山廣光¹、山崎真巳¹、斉藤和季^{1,2} (¹千葉大院薬、²理研PSC):シロイヌナズナにおける二つのMYB遺伝子同時過剰発現による遺伝子発現及びフラボノイド蓄積の効果. 第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
29. 及川彰¹、菊山宗弘²、三村徹郎³、斉藤和季^{1,4} (¹理研PSC、²新潟大理、³神戸大院理、⁴千葉大院薬):メタボロミクスによる様々な環境条件下における細胞内化合物の局在性の解明、第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
30. 大西美輪¹、姉川彩¹、七條千津子¹、Enrico Martinoia²、深城英弘¹、三村徹郎¹ (¹神戸大院理、²Univ. of Zurich):液胞膜エンジニアリングによる液胞代謝動態の解析、第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
31. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹ (¹神戸大院理):キャピラリー電気泳動/四重極-飛行時間型質量分析装置(Capillary Electrophoresis-Electrospray-Quadropole Time Of Flightmass spectrometry; CE-ESI-QTOF)を用いたシロイヌナズナのメタボローム解析、第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
32. 濱地康平¹、吉田勝久¹、大西美輪¹、小田祥久³、植村知博³、郷達明¹、佐藤雅彦⁴、馳澤盛一郎²、中野明彦^{3,5}、深城英弘¹、前島正義⁶、三村徹郎¹ (¹神戸大院理、²東京大院新領域、³東京大院理、⁴京都府立人間環境、⁵理研基幹研、⁶名古屋大院生命農学):シロイヌナズナの高塩環境下における液胞動態と塩蓄積機構の解析、第51回日本

植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)

33. 千葉基晶¹、浅野孝¹、奥山淳¹、斉藤和季^{1,2}、山崎真巳¹(¹千葉大院薬、²理研PSC): カンプトテシンを高生産するチャボイナモリ毛状根特異的に発現する MYB 様転写因子 OpMYB1 の機能解析. 日本薬学会第130年会(岡山 平成22年3月28-30日)
34. 青木考¹、佐々木亮介¹、須田邦宏¹、櫻井望¹、大西美輪²、姉川彩²、三村徹郎²(¹かずさDNA研、²神戸大院理): シロイヌナズナ液胞膜トランスポーター遺伝子過剰発現による細胞内代謝および遺伝子発現への影響、日本植物細胞分子生物学会(仙台 平成22年9月2日)
35. 鹿倉友美子¹、Somnuk Bunsupa¹、斉藤和季¹、山崎真巳¹(¹千葉大院薬): ルピナス属植物におけるキノリチジンアルカロイド生合成に関与するタンパク質の細胞内局在. 第28回日本植物細胞分子生物学会(仙台)大会・シンポジウム(仙台 平成22年9月2-3日)
36. 千葉基晶¹、浅野孝¹、奥山淳¹、斉藤和季¹、山崎真巳¹(¹千葉大院薬): カンプトテシンを高生産するチャボイナモリ毛状根特異的に発現する MYB 様転写因子 OpMYB1 について. 第28回日本植物細胞分子生物学会(仙台)大会・シンポジウム(仙台 平成22年9月2-3日)
37. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理): キャピラリー電気泳動/四重極-飛行時間型質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたオーキシン添加に応答するメタボローム解析、日本植物学会第74回大会(春日井 平成22年9月9-11日)
38. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理): キャピラリー電気泳動/四重極-飛行時間型質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたオーキシン添加に応答する代謝産物の同時定量解析、第52回日本植物生理学会年会(仙台 平成22年3月 東日本大震災により要旨集による発表)
39. 佐々木亮介¹、杉山裕子²、大西美輪³、姉川彩³、澤田有司⁴、平井優美⁴、三村徹郎³、青木考¹(¹かずさDNA研、²兵庫県立大環境人間、³神戸大院理、⁴理研PSC): 液胞膜トランスポーター候補遺伝子過剰発現シロイヌナズナ植物体における代謝物蓄積変動の解析、第52回日本植物生理学会年会(仙台 平成23年3月 東日本大震災により要旨集による発表)
40. 大西美輪¹、姉川彩¹、杉山裕子²、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²兵庫県立大環境人間): 植物液胞のポストゲノム解析、第52回日本植物生理学会年会(仙台 平成22年3月 東日本大震災により要旨集による発表)
41. Bunsupa, S.¹, Katayama, K.¹, Ikeura, E.¹, Oikawa, A.², Saito, K.^{1,2}, Yamazaki, M.²(¹千葉大院薬、²理研PSC): Cloning and characterization of an enzyme involved in quinolizidine alkaloids biosynthesis in *Lupinus angustifolius*. 第52回日本植物生理学会年会(仙台 平成22年3月 東日本大震災により要旨集による発表)
42. 山崎真巳¹、樋口真理¹、ワンワッタナー・ブンヤパー¹、斉藤和季¹(¹千葉大院薬): アカジソにおけるアントシアニン生産制御に関与するMBW複合体について. 第52回日本植物生理学会年会(仙台 平成22年3月 東日本大震災により要旨集による発表)
43. 山崎真巳¹、小林可菜英¹、浅野孝¹、斉藤和季¹(¹千葉大院薬): RNAサイレンシングならびに生合成中間体アナログ投与によるカンプトテシン生合成経路研究. 第29回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(福岡 平成23年9月6-8日)
44. Bunsupa, S.¹, Katayama, K.¹, Ikeura, E.¹, Oikawa, A.², Saito, K.^{1,2}, Yamazaki, M.¹(¹千葉大院薬、²理研PSC): Gateway to thr biosynthesis of quinolizidine alkaloids: Molecular characterization of lysine decarboxylase from *Lupinus* and related plants. 第29回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(福岡 平成23年9月6-8日)

〈国際会議〉

1. Bunsupa S.¹, Katayama K.¹, Oikawa A.², Saito K.^{1,2}, Yamazaki M.¹(¹千葉大院薬、²理研PSC): Identification and characterization of lysine/ornithine decarboxylase: a novel

enzyme involved in the first Step of quinolizidine alkaloids biosynthesis in *Lupinus angustifolius*. 2nd Banff Conference on Plant Metabolism, CS7. (June 24-28, 2010, Banff, Alberta, Canada)

③ ポスター発表 (国内会議 26 件、国際会議 22 件)

〈国内会議〉

1. 佐々木亮介¹、大西美輪²、飯島陽子¹、櫻井望¹、柴田大輔¹、三村徹郎²、青木考¹
(¹かずさ DNA 研、²神戸大院理)：シロイヌナズナ単離液胞および培養細胞代謝物の包括的アノテーション 日本植物生理学会第 49 会年会 (札幌 平成 20 年 3 月 20-22 日)
2. 佐々木亮介¹、大西美輪²、飯島陽子¹、櫻井望¹、柴田大輔¹、三村徹郎²、青木考¹
(¹かずさ DNA 研、²神戸大院理)：シロイヌナズナ単離液胞および培養細胞代謝物の包括的アノテーション。日本植物生理学会第 49 会年会 (札幌 平成 20 年 3 月 20-22 日)
3. Bunsupa S.¹, Ikeura E.¹, Saito K.¹, Yamazaki M.¹ (¹千葉大院薬)：Molecular cloning and functional identification of a novel lysine decarboxylase from *Lupinus angustifolius*. 日本薬学会第 128 年会 (横浜 平成 20 年 3 月 26-28 日)
4. 千田かおり¹、岡田岳人¹、峠隆之¹、及川彰²、田中健一¹、川合利佳¹、南部羽蘭¹、金谷重彦³、斉藤和季¹、山崎真巳¹ (¹千葉大院薬、²理研PSC、³奈良先端大)：漢方処方メタボロミクスー紫胡剤類を中心として。日本生薬学会第55回年会, 1P-088. (長崎 平成20年9月19-20日)
5. 大西美輪：植物インタクト液胞のポストゲノム解析。第3回メタボロームシンポジウム(山形 平成20年10月30日-11月1日)
6. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹ (¹神戸大院理)：キャピラリー電気泳動-四重極-飛行時間型質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたシロイヌナズナ葉中メタボローム解析。第50回日本植物生理学会年会(名古屋 平成21年3月21-24日)
7. Bunsupa S.¹, Ikeura E.¹, Saito K.¹ and Yamazaki M.¹ (¹千葉大院薬)：Cloning and characterization of differentially expressed genes involved in quinolizidine alkaloid biosynthetic pathway between bitter and sweet forms of *Lupinus angustifolius*. 日本薬学会第129年会(京都 平成21年3月26-28日)
8. 青木考¹、佐々木亮介¹、大西美輪²、姉川彩²、飯島陽子¹、櫻井望¹、三村徹郎² (¹かずさ DNA 研、²神戸大院理)：液胞膜トランスポーターを過剰発現させたシロイヌナズナ培養細胞を用いたメタボローム解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム (東京 平成 21 年 10 月 16 日)
9. 大西美輪¹、姉川彩¹、原田和生²、及川彰³、中山泰宗²、佐々木亮介⁴、七條千津子¹、深城英弘¹、杉山裕子⁵、Patrick G. Hatcher⁶、福崎英一郎²、Enrico Martinoia⁷、青木考⁴、三村徹郎¹ (¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研PSC、⁴かずさDNA研、⁵兵庫県立大環境人間、⁶Old Dominion Univ.、⁷Zurich Univ.)：植物細胞インタクト液胞を用いたポストゲノム解析と液胞膜エンジニアリングによる液胞代謝動態の解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム(東京 平成21年10月16日)
10. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹ (¹神戸大院理)：キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたシロイヌナズナ植物体メタボローム解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム(東京 平成21年10月16日)
11. 山崎真巳¹、小林可菜英¹、柏原恵美¹、浅野孝¹、スパアツ・シリカンタラマス¹、佐々木亮介²、飯島陽子²、青木考²、斉藤和季^{1,3} (¹千葉大院薬、²かずさ DNA 研、³理研PSC)：遺伝子抑制毛状根のメタボローム解析によるカンプトテシン生合成中間体の探索、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム (東京 平成 21 年 10 月 16 日)

12. 青木考¹、佐々木亮介¹、大西美輪²、姉川彩²、飯島陽子¹、櫻井望¹、三村徹郎²(¹かずさDNA研、²神戸大院理):液胞膜トランスポーターを過剰発現させたシロイヌナズナ培養細胞を用いたメタボローム解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第2回公開シンポジウム(東京 平成21年10月16日)
13. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理):キャピラリー電気泳動-質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたシロイヌナズナメタボローム解析、第4回メタボロームシンポジウム(横浜 平成21年11月18-19日)
14. 大西美輪¹、姉川彩¹、原田和生²、及川彰³、中山泰宗²、七條千津子¹、深城英弘¹、福岡英一郎²、Enrico Martinoia⁴、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研PSC、⁴Zurich Univ.):植物細胞インタクト液胞を用いたポストゲノム解析と液胞膜エンジニアリングによる液胞代謝動態の解析、第4回メタボロームシンポジウム(横浜 平成21年11月18-19日)
15. 及川彰¹、松田史生¹、菊山宗弘²、三村徹郎³、斉藤和季^{1,4}(¹理研PSC、²新潟大理、³神戸大院理、⁴千葉大院薬):オオシヤジクモ節間細胞を用いた化合物の細胞内局在性および挙動の解明、第4回メタボロームシンポジウム(横浜 平成21年11月18-19日)
16. 中林亮¹、榊原圭子²、松田史生²、峠隆之¹、北島満里子¹、高山廣光¹、山崎真巳¹、斉藤和季^{1,2}(¹千葉大院薬、²理研PSC):シロイヌナズナにおける2つのMYB遺伝子同時過剰発現による遺伝子発現及びフラボノイド蓄積への効果、第4回メタボロームシンポジウム(横浜 平成21年11月18-19日)
17. 佐々木亮介¹、須田邦裕¹、大西美輪²、飯島陽子¹、櫻井望¹、柴田大輔¹、三村徹郎²、青木考¹(¹かずさDNA研、²神戸大院理):液胞膜トランスポーター候補遺伝子過剰発現シロイヌナズナ植物体の代謝物解析、第51回日本植物生理学会年会(熊本 平成22年3月18-21日)
18. Aoki K.¹、Sasaki R.¹、Ohnishi M.²、Anegawa A.²、Sakurai N.¹、Mimura T.²(¹かずさDNA研、²神戸大院理): Changes in metabolite accumulation by the overexpression of a vacuolar membrane transporter gene in Arabidopsis leaves and suspension cultured cell、BMB2010(神戸 平成22年12月7-10日)
19. 大西美輪¹、姉川彩¹、杉山裕子²、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²兵庫県立大環境人間):植物液胞のポストゲノム解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)
20. 姉川彩¹、大西美輪¹、七條千津子¹、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院理):キャピラリー電気泳動/四重極-飛行時間型質量分析装置(CE-ESI-QTOF)を用いたオーキシン添加に应答する代謝産物の同時定量解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)
21. 山本浩太郎¹、大西美輪¹、姉川彩¹、七條千津子¹、深城英弘¹、山崎真巳²、三村徹郎¹(¹神戸大院理、²千葉大院薬):ニチニチソウ培養細胞を用いた二次代謝に関わる液胞機能の解析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)
22. 青木考¹、佐々木亮介¹、小田原真樹²、須田邦裕²、大西美輪³、姉川彩³、杉山裕子⁴、三村徹郎³(¹かずさDNA研、²大阪府大生命環境、³神戸大院理、⁴兵庫県立大環境人間):液胞膜トランスポーター遺伝子形質転換細胞のメタボローム解析による輸送基質代謝物の候補化、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)
23. 山崎真巳¹、浅野孝¹、青木考^{2,3}、佐々木亮介²、斉藤和季^{1,4}(¹千葉大院薬、²かずさDNA研、³大阪府大生命環境、⁴理研PSC):RNAサイレンシングとメタボロームならびにトランスクリプトームによるカンプトテシン合成経路の解明、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)

24. 杉山裕子¹、Patrick Hatcher²、大西美輪³、姉川彩³、青木考^{4,5}、佐々木亮介⁵、三村徹郎³(¹兵庫県立大環境人間、²Old Dominion University、³神戸大院理、⁴大阪府大生命環境、⁵かずさDNA研): 超高分解能FT-ICR-MSによる液胞内低分子有機物のノンターゲット分析、CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」研究領域第4回公開シンポジウム(東京 平成23年11月1日)
25. 姉川彩¹、大西美輪¹、杉山裕子²、七條千津子¹、深城英弘¹、Hatcher Patrick G.³、三村徹郎¹(¹神戸大院・理・生物、²兵庫県立大・環境人間、³Department of Chemistry and Biochemistry, Old Dominion Univ.): 植物液胞のポストゲノム解析、第53回日本植物生理学会年会(京都 平成22年3月16-18日)
26. 大西美輪¹、姉川彩¹、Bo Burla²、七條千津子¹、Enrico Martinoia²、深城英弘¹、三村徹郎¹(¹神戸大院・理、²Univ. of Zurich): 液胞膜エンジニアリングによる液胞代謝動態の解析、第53回日本植物生理学会年会(京都 平成22年3月16-18日)

〈国際会議〉

1. Yamazaki M.¹, Ikeura E.¹, Okada T.¹ and Saito K.¹(¹千葉大院薬): Profiling and characterization of bitter-lupin specific genes. EMBO Conference series on Plant Molecular Biology "From basic genomics to systems biology" (May 2-4, 2007, Ghent, Belgium)
2. Nakabayashi R.¹, Yonekura-Sakakibara K.², Matsuda F.², Tohge T.¹, Kitajima M.¹, Yamazaki M.¹, Takayama H.¹, Saito K.¹(¹千葉大院薬、²理研PSC): Arabidopsis metabolome-isolation and structural elucidation of flavonoids in Arabidopsis mutants for biosynthetic study. 7th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products. (June 22-27, 2008, La Jolla, California, USA)
3. Anegawa A.¹, Ohnishi M.¹, Shichijo C.¹, Kosuge K.¹, Mimura T.¹(¹神戸大院理): Analysis of plant hormones by capillary electrophoresis quadrupole time-of-flight (CE-Q-TOF). 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
4. Ohnishi M.¹, Anegawa A.¹, Harada K.², Oikawa A.³, Shichijo C.¹, Fukaki H.¹, Sugiyama Y.⁴, Hatcher P.G.⁵, Fukusaki E.², Mimura T.¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研PSC、⁴兵庫県立大環境人間、⁵Old Dominion Univ.): Metabolic analysis of plant intact vacuole. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
5. Oikawa A.¹, Mimura T.², Saito K.^{1,3}(¹理研PSC、²神戸大院理、³千葉大院薬): Metabolite profiling of a single vacuole in Chara Corallina. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
6. Nakabayashi R.¹, Yonekura-Sakakibara K.², Matsuda F.², Tohge T.¹, Kitajima M.¹, Takayama H.¹, Yamazaki M.¹, Saito K.^{1,2}(¹千葉大院薬、²理研PSC): Flavonoid profiling and transcriptome in Arabidopsis overexpressing two MYB genes. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
7. Yamazaki M.¹, Okuyama J.¹, Asano T.¹, Saito K.¹(¹千葉大院薬): Characterization of transcription factor expressed in camptothecin producing hairy roots. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
8. Chida K.¹, Okada T.¹, Tohge T.¹, Oikawa A.², Tanaka K.¹, Kawai R.¹, Nanbu U.¹, Kanaya S.³, Saito K.¹, Yamazaki M.¹(¹千葉大院薬、²理研PSC、³奈良先端大): Non-target analysis of KAMPO prescriptions. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
9. Sasaki R.¹, Ohnishi M.², Iijima Y.¹, Sakurai N.¹, Shibata D.¹, Mimura T.², Aoki K.¹(¹かずさDNA研、²神戸大院理): A comprehensive annotation of metabolites in the isolated vacuoles and suspension cultured cells of Arabidopsis. 5th International Conference on Plant Metabolomics (July 15-18, 2008, Yokohama)
10. Aoki K.¹, Sasaki R.¹, Ohnishi M.², Anegawa A.², Sugiyama Y.³, Iijima Y.¹, Sakurai N.¹, Yamazaki M.⁴, Mimura T.²(¹かずさDNA研、²神戸大院理、³兵庫県立大環境人間、⁴

- 千葉大院薬): Metabolomics analysis of Arabidopsis suspension cultured cells that overexpress a putative vacuolar membrane transporter. The 20th International Conference on Arabidopsis Research (June 30-July 4, 2009, Edinburgh, Scotland, United Kingdom)
11. Yoshida K.¹, Ohnishi M.¹, Fukao Y.², Okazaki Y.³, Hayashi F.¹, Fujiwara M.², Nakanishi Y.⁴, Saito K.³, Shimmen T.⁵, Fukaki H.¹, Maeshima M.⁴, Mimura T.¹(¹神戸大院理、²奈良先端大、³理研 PSC、⁴名古屋大院生命農学、⁵兵庫県立大院生命): Membrane microdomains in the plant vacuole. 3rd Asian Symposium on Plant Lipids (November 27-29, 2009, Yokohama)
 12. Aoki K.¹, Sasaki R.¹, Ohnishi M.², Anegawa A.², Sugiyama Y.³, Suda K.¹, Sakurai N.¹, Mimura T.²(¹かずさ DNA 研、²神戸大院理、³兵庫県立大環境人間): Metabolic changes by the overexpression of a putative vacuolar membrane transporter gene in Arabidopsis leaves and suspension cultured cell., 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 – 10, 2010, Yokohama)
 13. Ohnishi M.¹, Anegawa A.¹, Harada K.², Oikawa A.³, Nakayama Y.², Sasaki R.⁴, Shichijo C.¹, Fukaki H.¹, Sugiyama Y.⁵, Aoki K.⁴, Hatcher P.G.⁶, Fukusaki E.², Mimura T.¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研 PSC、⁴かずさ DNA 研、⁵兵庫県立大環境人間、⁶Old Dominion Univ.): Metabolomic analysis of plant intact vacuoles isolated from genetically engineered cells., 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 – 10, 2010, Yokohama)
 14. Aoki K.¹, Sasaki R.¹, Ohnishi M.², Anegawa A.², Sugiyama Y.³, Suda K.¹, Sakurai N.¹, Mimura T.²(¹かずさ DNA 研、²神戸大院理、³兵庫県立大環境人間): Metabolic changes by the overexpression of a putative vacuolar membrane transporter gene in Arabidopsis leaves and suspension cultured cell., 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 – 10, 2010, Yokohama)
 15. Anegawa A.¹, Ohnishi M.¹, Shichijo C.¹, Fukaki H.¹, Mimura T.¹(¹神戸大院理): Simultaneous measurements of metabolites and plant hormones in *Arabidopsis thaliana* using capillary electrophoresis electrospray quadrupole time-of-flight (CE-ESI-QTOF)., 21st International Conference on Arabidopsis Research (June 6 – 10, 2010, Yokohama)
 16. Sugiyama Y.¹, Hatcher P.G.², Ohnishi M.³, Anegawa A.³, Aoki K.⁴, Sasaki R.⁴, Sakurai N.⁴, Mimura T.³(¹兵庫県立大環境人間、Old Dominion Univ、神戸大院理、⁴かずさ DNA 研): Analysis of low molecular weight organic molecules in Arabidopsis vacuoles using an ultra-high resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry., CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto)
 17. Aoki K.¹, Sasaki R.¹, Ohnishi M.², Anegawa A.², Sugiyama Y.³, Suda K.¹, Sakurai N.¹, Mimura T.²(¹かずさ DNA 研、²神戸大院理、³兵庫県立大環境人間): Metabolic changes by the overexpression of a putative vacuolar membrane transporter gene in Arabidopsis leaves and suspension cultured cell., CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto,)
 18. Sugiyama Y.¹, Hatcher P.G.², Ohnishi M.³, Anegawa A.³, Aoki K.⁴, Sasaki R.⁴, Sakurai N.⁴, Mimura T.³(¹兵庫県立大環境人間、²Old Dominion Univ、³神戸大院理、⁴かずさ DNA 研): Analysis of low molecular weight organic molecules in Arabidopsis vacuoles using an ultra-high resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry., CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto)
 19. Anegawa A.¹, Ohnishi M.¹, Shichijo C.¹, Fukaki H.¹, Mimura T.¹(¹神戸大院理): Simultaneous measurements of metabolites and plant hormones in *Arabidopsis thaliana* using Capillary Electrophoresis Electrospray Quadrupole Time-Of-Flight (CE-ESI-QTOF)., CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto)
 20. Ohnishi M.¹, Anegawa A.¹, Harada K.², Oikawa A.³, Nakayama Y.², Sasaki R.⁴, Shichijo C.¹, Fukaki H.¹, Sugiyama Y.⁵, Aoki K.⁴, Hatcher P.G.⁶, Fukusaki E.², Mimura T.¹(¹神戸大院理、²大阪大院工、³理研 PSC、⁴かずさ DNA 研、⁵兵庫県立大環境人間、⁶Old Dominion Univ.): Metabolomic analysis of plant intact vacuoles isolated from genetically engineered cells., CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto)

21. Yamazaki M.¹, Asano T.¹, Kashihara E.¹, Kobayashi K.¹, Aoki K.², Sasaki R.², Iijima N.², Saito K.¹ (¹千葉大院薬、²かずさ DNA 研): Pathway mining of camptothecin production in hairy roots of *Ophiorrhiza pumila*. CREST Workshop on Plant metabolism (June 10, 2010, Kyoto)
22. Nakabayashi R.¹, Yonekura-Sakakibara K.², Urano K.¹, Mastuda F.², Kojima M.¹, Sakakibara H.², Shinozai K.², Tohge T.¹, Yamazaki M.¹, Saito K.^{1,2} (¹千葉大院薬、²理研PSC): A novel function of flavonoids for abiotic stress tolerance. Metabolomics2010, P6B-007. (June 27-July 1, 2010. Amsterdam, Netherlands)

(4)知財出願
ナシ

(5)受賞・報道等
①受賞

1. 山崎真巳: 平成 22 年度日本生薬学会学術貢献賞
「薬用成分の生合成制御に関するゲノム機能科学的研究」

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

- 千葉大学:抗がん物質生産植物の自己耐性機構解明(発表論文2)の内容について朝日新聞(平成20年4月29日)、読売新聞(平成20年4月29日)、薬事日報(平成20年5月9日)、日本科学新聞(平成20年5月16日)等で報道された。また、この成果は、Ann Osborn博士(英国 John Innes Centre)によりFaculty of 1000Biology(平成20年6月6日)で取り上げられた。
- 漢方方剤について植物二次代謝産物のメタボローム解析技術を応用した研究について、BTJジャーナル(平成20年9月号)で報道された。
- 科学新聞「日本薬学会第130年会 ハイライト講演注目の10題紹介 有用物質生産向上としての植物細胞」平成22年3月26日
- 理研プレスリリース「藻類が作り出す代謝物の局在・移動を単一細胞内で初めて確認ー藻類「オーストラリアシヤジクモ」の巨大単一細胞を用いてメタボローム解析ー」平成23年9月6日

§ 6 研究期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H20年 1月18日	フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析研究会	兵庫県立大学環境人間学部	25人	フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析について、基礎原理から研究への応用まで3人(うち2名:杉山・飯島は糖プロジェクトメンバー)の研究者が講演し、討論を行った。
H20年 7月15日～ 18日	5 th International Conference on Plant Metabolomics	横浜市、Pacifico Yokohama	約250人	植物メタボロミクスに関する国際会議、三村と山崎が国内組織委員として参加
H20年 7月17日	JST・CREST Workshop “Plant metabolism and	横浜市、Pacifico	約80人	5 th International Conference on Plant Metabolomics 内

	its regulation”	Yokohama		で、柳澤チーム、平井チームとともに開催
H20年 11月7日	「代謝」研究領域第1回 公開シンポジウム	コクヨホール	251人	CREST 研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表
H21年 10月16日	「代謝」研究領域第2回 公開シンポジウム	日本科学未来館・みらいCANホール	155人	CREST 研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表
H21年 12月17日	植物化学シンポジウム	神戸大学 百年記念館	約80人	植物化学研究会と共催で「細胞内、細胞間で構造化される代謝」というシンポジウムを開催した
H22年 6月9日	21st International Conference on Arabidopsis Research Concurrent session: Metabolism and Systems Biology	横浜市、 Pacifico Yokohama	約500人	21st International Conference on Arabidopsis Research にあわせて、植物系合同CRESTセッションを開催した。
H22年 6月10日	CREST Workshop on Plant metabolism	京都市 大学コンソーシアム京都	26人	上記CRESTセッション招待外国研究者と植物系CRESTチーム若手による研究会を開催した。
H23年 11月1日	「代謝」研究領域第4回 公開シンポジウム	東京大学・ 弥生講堂	139人	CREST 研究課題の成果について口頭およびポスターにて発表

§7 結び

(文責 三村 徹郎、本項は中間報告書に記した文章に現時点での感想を書き加えたものである)

★液胞を構成するタンパク質、代謝物質の網羅的解析から得られた新しい知見

植物細胞を特徴づけるオルガネラとして、液胞が強く注目されるようになったのは、この10～15年ぐらいである。しかし、その機能を分子レベルで明らかにしようとする研究は、まだ始まったばかりである。

研究代表者の三村は、ドイツの光合成代謝で著名な研究室に留学し、そこで、液胞の新しい単離方法を習い、それをさらに改良しながら無機イオン代謝の研究に結びつける努力をしてきた。その後、液胞の機能をより広い観点から明らかにしよう、本研究で、ポストゲノム手法としてのプロテオームとメタボローム解析法を結びつける研究をしてみたいと思い、今にいたっている。

液胞については、自分なりに理解しているつもりだったが、今回、この研究を始めてみて、液胞について、まだこれだけ新しいことが出てくるのかと自分でもかなり驚いたというのが正直なところである。

液胞研究に近いところにいた分、教科書的発想にとらわれていた面もあるが、まず、液胞膜タンパク質プロテオーム解析から、液胞膜に電子伝達に関わるタンパク質が見出された。液胞内で酸化還元反応が起こっているとは、それまであまり考えたこともなかったが、液胞内にも、それに見合う酸化還元系の酵素タンパク質が存在するようなので、その他のタンパク質と併せて考えると、液胞というのは葉緑体やミトコンドリアと同様、ある種の代謝コンパートメントとして存在するという可能性

が非常に高くなったと思われる。これは、蓄積・分解系と考えられてきた液胞機能に新しい描像を加えるものである。

実際、山崎グループで明らかにされつつある二次代謝物質の生成過程には、多数の酸化還元反応が関わっている。これらの反応に必要な電子をどのように供給するかは、これらの二次代謝産物が、有用薬剤や産業的に重要な物質であることを考えると、基礎科学としてのみならず、応用分野においても重要な意味を持つと考えている。これを明確にするために、最終年度に入ってからではあるが、多彩な抗ガン剤を産生することで著名なニチニチソウ培養細胞で同様の解析を始めることとした。

チャボイナモリ、ニチニチソウともモデル植物ではないため、分子レベルの詳細な解析を可能にするリソースが揃っている訳ではない。しかし、質量分析器を中心としたポストゲノム解析と、次世代シーケンサーの発展は、これら有用性の高い非モデル植物の解析を可能にしつつあると感じている。

さらに、長年植物細胞におけるリン酸代謝を扱ってきた人間として、フォスファターゼだらけの液胞内に有機リン酸化合物が存在するというのも大きな驚きだった。液胞にリン酸化合物が運びこまれる機構は、オートファジーぐらいだろうと勝手に思いこんでいたが、今回得られたデータなどから、膜によって調節される輸送機構を考える必要があり、さらに細胞質のリン酸化合物の濃度調節に機能している可能性も考えられそうである。

いずれも、ポストゲノム解析手法の中から得られた新しい知見であり、新しい実験手法が生物の新しい側面に光をあててくれたものである。これらのデータをどのように統合していくかが、今後の成果に極めて重要だと考えている。

★質量分析計を用いたプロテオーム、メタボローム解析

上記の知見のもととなったポストゲノム解析手法としての、プロテオーム、メタボローム解析は、強力な武器ではあるが、逆に極めて難しい研究手法であることも強く認識できるようになった。論文や学会発表などの華麗なデータを見ていると、これらの実験が大変強力な武器として多くの方々に認識されていると思われ、また自分自身もそのように捉えていた。しかし、実際に自分の研究室で実験を始めてみると、質量分析機という装置を制御することがいかに困難か、また出てきた膨大なデータの中から、意味のある結果を見出すのに必要な手順がどれほど面倒かということを実感させられている。

また、質量分析器を、常に安定して稼働可能な状態においておくための多額な費用は、残念ながらこのCRESTだけでは準備できなかった。そのため、神戸大学理学研究科にも随分と会計的サポートを受けざるを得なかったことをここに記しておきたい。

当初、測定は質量分析を専門としている研究室に依頼し、自分の研究室ではそのための材料調整を主にやり、質量分析機による測定は副次的に行えば良いと考えて実験計画を立てていたが、それではこの解析手法の本質が全く判らないまま、研究の方向性にも十分な理解が出来ずに研究を進めるということになったはずである。その点で、自前の質量分析器を持つことを強く薦めていただいた前領域総括の故鈴木絃一先生には、お礼を申し上げたい。

最先端研究機器を利用し、それを理解するための機会を与えてもらったことに、大変感謝している。

★将来の見通し

CRESTとしての研究はまもなく終了するが、道半ばのデータも多いことから、何とか解析を続けていくことを目指している。特に、質量分析機による測定結果の解析として、世界的にもデータベースが完全でないノンターゲット分析において、最終的に十分なレベルの物質同定が可能かどうかは、尚難しい点が残っている。他の分子・細胞生物学的手法と組み合わせることで、これを達成したいと考えている。

また、ポストゲノム解析を上手く組み合わせることで、モデル植物ではない植物でも解析可能な手法の一般化を進めたい。これが可能になれば、応用面での有用性は極めて高いものになると期待

している。

★CREST について

研究が進むにつれて、当初の実験計画だけでは処理仕切れない部分があくつも出てきたが、これまで追加の支援を十分にいただくことで、計画につまずきが出ることなく進んで来ている。この点については、大変感謝している。

また、研究費の使用法についても、現場の実情に合わせた柔軟な使用を認めていただき、研究を実施する側としては現在まで問題を感じたことはない。

本領域では、特に他の植物関連2チーム(柳澤修一チーム、平井優美チーム)との協力体制が順調に行われ、国際会議やワークショップの開催は、いつも一緒にさせていただけた。事務的な面はもとより、研究面でも常に強い刺激を得ることが出来たことに感謝する。