

(平成 25 年度 研究実施報告)

国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「低炭素社会のためのメタボロミクス」)

研究課題名

「藻類の光独立・混合栄養代謝を解き明かす計算化学資源の統合」

平成25年度実施報告書

代表者氏名 有田 正規

(国立遺伝学研究所生命情報研究センター・教授)

1. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要 公開

背景

平成24年度は主要解析対象を *Euglena gracilis* (ミドリムシ) とし、糖代謝(特にパラミロン)とワックスを含む脂質合成代謝のバランス解明を目標とした。ただし日米間での研究員の交流は実現できなかった。その結果を踏まえ、25 年度は論文発表およびチーム間の連携を目標にした。データの取得と解析に力を入れ、日本側グループ間、さらに日米間の連携を強化する成果およびその論文化を目指した。

実施内容

中心的役割をはたす東京大学(東大)チームは全体取りまとめをおこなうとともに、代謝流量の数理モデリングとミドリムシの代謝物計測を実施した。日本側グループでの全体会議は9月のJST-NSF公式ワークショップまで定期的におこなったが、夏に代表者が本務先を国立遺伝学研究所(遺伝研)に変更することが決定し、11月より実際に移動したため、年度後半は全体取りまとめの機会が減少した。また東大に所属する研究員および学生は一切移動しなかったため、遺伝研で全く新しいメンバーを雇用して研究を立ち上げるようになった。

代謝流量のモデリングはイデアルによる代数的手法で脂質代謝の解析を目指したが、モデルにおける制約を現実の制約にあわせることができないため年度前半で研究の中止を決定した。年度後半は遺伝子発現におけるノイズの影響を理論的に解析する研究のみ実施した。いっぽう、ミドリムシの代謝物計測は順調に進み、大阪府立大学(府大)と連携して脂肪酸、アルコール、それらのメチルエステルの同時計測に成功している。この一斉分析結果からワックスエステル量を逆算することで、その生成量を極めて正確に定量できるようになった。

奈良先端大(奈良)チームは学生が新しく参加し、藻類データベースを構築するとともに、ミドリムシのRNA-Seq解析を主導した。藻類のBicycleデータベースは94種の代謝遺伝子96,641件を収録し、生物種、酵素反応と遺伝子配列情報を自由に検索・閲覧できる(<http://kanaya.naist.jp/bicycle/top.html>)。研究が進展した生物種の情報がより多く収録されており、*Chlamydomonas* はモデル生物種 *reinhardtii* のものを含んで14,503件の情報がある。これらの系統的分類を現在実施中である。

RNA-Seq解析からは、ミドリムシの遺伝子発現パターンを推測できた。まず培養2日、4日後の状態では通常培養と嫌気培養の間で発現量に大きな違いがみられない。また通常株と抗生物質によりクロロプラストを欠損させた株の間でも、変化に大きな違いを見つけれなかった。発現する配列にはいずれもクラミドモナスや好熱性水素細菌に近いものが多く同定できた。また、TCA回路を逆に回る還元的順路をおこなう遺伝子発現パターンも確認できた。

府大チームはミドリムシの培養系および脂質計測を順調に進め、窒素ガス曝気によって絶対嫌気条件下に移行させた系の計測を開始した。GC-MSによる脂肪酸(ワックス含む)解析では、上述のように脂肪酸とアルコールの一斉分析を実現している。ここでもワックス合成が嫌気状態の時間に線形比例して増加することが示されており、嫌気条件化でワックス合成遺伝子が大幅に誘導または活性化されない状況を示唆している。代謝物量も通常株と葉緑体欠損株で変化がなく、RNA-Seq解析と一致する。

カロテノイドやクロロフィルなど色素の計測も進め、葉緑体欠損株はクロロフィルの欠損だけでなく、Alloxanthinやbeta-caroteneが増加していることを確認した。また、府大からUC Davis Genome Centerに研究メンバーを派遣し、UC Davisが開発したLipidBlast(MS/MSフラグメントライブラリーとin silicoの脂質構造注釈プログラム)を利用したグリセロ脂質解析実験の実施計画を策定し、実験は府大で行った。その結果、嫌気条件化における複数のリゾホスファチジルエタノールアミンの増加、そしてそれ以外の脂質組成に変化がないことを明らかにし、論文

発表をおこなった。この論文は日米のメンバーが参画した初の共著論文である。

日米の研究交流体制

府大チームから UC Davis Genome Center に研究メンバーを派遣。遺伝研チームからも研究員を派遣。米国側と共同して脂質の MS/MS 解析用ソフトウェアを開発した。これは 26 年度の後半にも再び実施する予定である。また奈良チームは平成 26 年度から UC Davis 内に研究者が常駐できる大学の分室を設置する手筈を整え、本格的な人材派遣と交流を 26 年度より開始予定である。米国側からは中国系の大学院生を 2 ヶ月程度日本に迎える予定であったが、VISA の関係で日本に派遣された場合に米国へ再入国できないことが判明し、計画が延期された。

2. 研究実施体制 公開

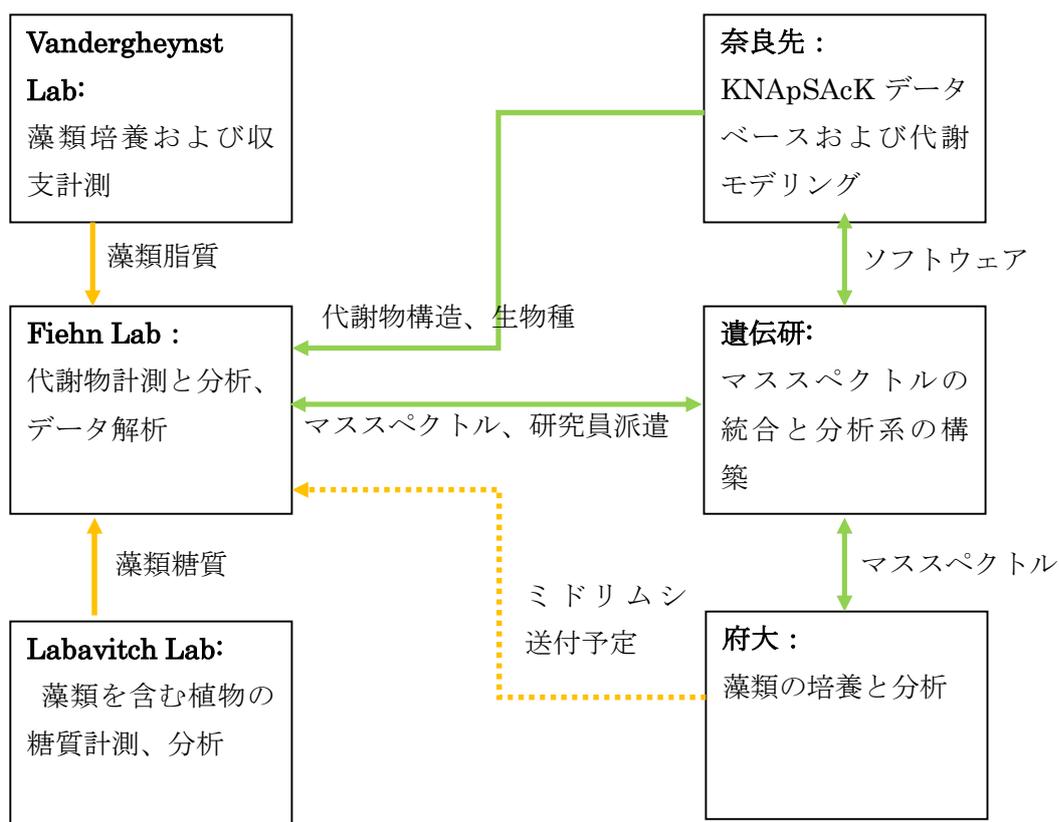
2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	有田 正規	東京大学	大学院理学系研究科	准教授
		国立遺伝学研究所	生命情報研究センター	教授
主な共同研究者	金谷 重彦	奈良先端科学技術大学院大学	情報科学研究科	教授
主な共同研究者	太田 大策	大阪府立大学	大学院生命環境科学研究科	教授

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	Oliver Fiehn	UC Davis	Genome Center	教授
主な共同研究者	Jane Vanderghenst	UC Davis	Dept. Biol. Agric. Engineer.	教授
主な共同研究者	John Labavitch	UC Davis	Dept. Plant Sci.	教授

2-3. 両国の研究実施体制



3. 原著論文発表 公開

3-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 4 件	(0 件)
計 4 件	(0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

1. Tsugawa H, Arita M, Kanazawa M, Ogiwara A, Bamba T, Fukusaki E “MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics” *Anal Chem* 85(10):5191-5199, 2013
2. Katsuragi T, Ono N, Yasumoto K, Altaf-Ul-Amin M, Hirai MY, Sriyudthsak K, Sawada Y, Yamashita Y, Chiba Y, Onouchi H, Fujiwara T, Naito S, Shiraishi F, Kanaya S “SS-mPMG and SS-GA: tools for finding pathways and dynamic simulation of metabolic networks” *Plant Cell Physiol* 54(5):728-39, 2013
3. Ikeda S, Abe T, Nakamura Y, Kibinge N, Hirai Morita A, Nakatani A, Ono N, Ikemura T, Nakamura K, Altaf-Ul-Amin M, Kanaya S “Systematization of the protein sequence diversity in enzymes related to secondary metabolic pathways in plants, in the context of big data biology inspired by the KNApSAcK motorcycle database” *Plant Cell Physiol* 54(5):711-727, 2013
4. Sakurai N, Ara T, Kanaya S, Nakamura Y, Iijima Y, Enomoto M, Motegi T, Aoki K, Suzuki H, Shibata D “An application of a relational database system for high-throughput prediction of elemental compositions from accurate mass values” *Bioinformatics* 29, 290-291, 2013

② 未発行論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 3 件	(1 件)
計 3 件	(1 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

5. Tsugawa H, Kanazawa M, Ogiwara A, Arita M “MRMPROBS Suite for metabolomics using large-scale MRM assays” *Bioinformatics* (Accepted)
6. *Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai R, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D “Exploration of Polar Lipid Accumulation Profiles in *Euglena gracilis* Using LipidBlast, a MS/MS Spectral Library Constructed in Silico” *Biosci Biotech Biochem* (Accepted)
本グループ全体が協力して実施したユーグレナ計測論文の第一報である。嫌気条件下におけるワックス合

成時にリゾホスファチジルエタノールアミン量が有意に変化することを明らかにした。

7. Nakamura Y, Afendi FM, Parvin AK, Ono N, Tanaka K, Hirai Morita A, Sato T, Sugiura T, Altaf-Ul-Amin M, Kanaya S “KNApSAcK Metabolite Activity Database for retrieving the relationships between metabolites and biological activities” *Plant Cell Physiol* 55(1) (in print)

以上