

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「メタボロミクス：低炭素社会に向けた植物特異的代謝解明に資
する基盤研究推進」

平成 23 年度実施報告書

研究代表者 齊藤 和季

(独) 理化学研究所 植物科学研究センター 副センター長・グループデ
ィレクター

1. 研究実施の概要

メタボロミクスはシステム生物学の重要な一分野であるが、多くの技術的な課題が残されている。本提案の国際共同チームは焦点を絞った生物学的な研究を推進するために、これらの技術的な課題(精度の高い代謝物アノテーションの向上など)に統合的なアプローチで取り組む。本年度は以下の研究を行った。

1. 植物代謝の遺伝子アノテーション

シロイヌナズナにおけるフェニルプロパノイド代謝などのゲノム機能科学(未知遺伝子の機能同定と代謝物同定)を推進し、新規遺伝子の生化学的、生物学的機能を同定する研究を進めた。特に、機能未同定の酵素、転写因子、未アノテーション遺伝子などに注目し、本年度は生物学的試料の準備を行った。

シロイヌナズナにおいて広い意味での脂質代謝に関する未知遺伝子をメタボロミクスとバイオインフォマティクスを駆使して推定し、それらの機能を逆遺伝学および逆生化学的手法によって同定する研究を開始した。特に、配列情報からアノテーションは付されているが機能未確定遺伝子や葉緑体移行性タンパク質で環境ストレスによって誘導される遺伝子に注目してその機能同定の計画を策定し、バイオインフォマティクスにより候補遺伝子の絞り込みと生物学的試料の準備を行った。

2. 植物代謝物アノテーション

複数種類の安定同位体ラベル(炭素、窒素、酸素、硫黄の安定同位体)と超高分解能 FT-ICR-MS や UPLC-Q-TOF-MS などを組み合わせて、正確な元素組成を元にした代謝物アノテーションの効率化および精密化を図る研究を開始した。本年度は生物学的試料の準備と、予備的検討を行った。

特定の外来遺伝子(酵素、転写因子など)を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体での生物学的考察にもとづいて、シロイヌナズナにおける組織的な代謝物アノテーションを進める研究を進めた。本年度はそのための生物学的試料の準備を行った。

植物特異的代謝物ライブラリーの充実を図り、それらの質量分析データを取得した。同時にこれらのデータを元にしたアノテーションパイプラインの作成を開始した。

本年度は12月から3月までの4ヶ月間だけの成果であり、来年度以降それぞれの項目でさらに大きな進展が期待される。

2. 研究実施体制

(1)「理化学研究所」グループ

① 研究者名(当該研究実施年度の所属、役職)

	氏名	所属	役職	参加時期
○	斉藤 和季	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	副センター長 グループディレクター	H23.12～
	篠崎 一雄	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	センター長 グループディレクター	H23.12～
	菊地 淳	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	チームリーダー	H23.12～
	榊原 圭子	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	上級研究員	H23.12～
	草野 都	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研究員	H23.12～
	岡咲 洋三	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研究員	H23.12～
	及川 彰	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研究員	H23.12～
	明賀 史純	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研究員	H23.12～
	福島 敦	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研究員	H23.12～
	中林 亮	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	特別研究員	H23.12～
	松田 史生	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	客員研究員	H23.12～
	小林 誠	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	テクニカルスタッフ I	H23.12～
	鈴木 実	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	テクニカルスタッフ I	H23.12～
	山田 豊	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	テクニカルスタッフ II	H23.12～
	Krishna Sridevi	(独)理化学研究所 植物科学研究センター	研修生	H23.12～

② 研究項目

1. 炭素分配と植物特異的代謝の遺伝子アノテーション
 - a. リグニンなどの細胞壁遺伝子の機能解明。
 - b. フェニルプロパノイド代謝などの遺伝子の生化学的、生物学的機能を同定とバイオテクノロジーへの応用。
 - c. シロイヌナズナにおける脂質代謝に関する未知遺伝子の機能を逆遺伝学および逆生化学的手法によって同定する。
2. 植物代謝物アノテーション
 - a. 高分解能 NMR によって未同定代謝物ピークのアノテーションを行う。
 - b. 安定同位体ラベルと超高分解能 FT-ICR-MS や UPLC-Q-TOF-MS などを組み合わせて代

謝物アノテーションの効率化および精密化を図る。

- c. 特定の外来遺伝子を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体での生物学的考察にもとづいて、シロイヌナズナにおける組織的な代謝物アノテーションを進める。
- d. 植物特異的代謝物ライブラリーの充実を図り、それらの質量分析データを取得する。

(2)「千葉大」グループ(研究機関別)

①研究参加者(当該研究実施年度の所属、役職)

	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	H23.12～

②研究項目

- 1. b および 1. c シロイヌナズナを宿主として用い、機能未同定の酵素、転写因子、未アノテーション遺伝子などを導入した変異体を作製する。
- 2. c 機能既知の特定の外来遺伝子(酵素、転写因子など)を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体を作製する。

(3)「かずさ」グループ(研究機関別)

①研究者名(当該研究実施年度の所属、役職)

	氏名	所属	役職	参加時期
○	鈴木 秀幸	財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部	主任研究員	H23.12～
	細内 敦	財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部	技術専門員	H23.12～
	須田 邦裕	財団法人かずさ DNA 研究所・産業基盤開発研究部	技術員	H23.12～

②研究項目

- 2. b 安定同位体ラベルと超高分解能 FT-ICR-MS や UPLC-Q-TOF-MS などを組み合わせて代謝物アノテーションの効率化および精密化を図る。
- 2. c 特定の外来遺伝子を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体での生物学的考察にもとづいて、シロイヌナズナにおける組織的な代謝物アノテーションを進める。

3. 研究実施内容

「理化学研究所」グループ (研究機関別)

1. 炭素分配と植物特異的代謝の遺伝子アノテーション

1.a リグニンなどの細胞壁組成に関する遺伝子アノテーション

H23 年度の研究計画書通り順調に進んでおり、次年度以降においても米国側が主導的に研究を推進し、日本側はメタボローム解析パイプライン (GC-MS、CE-MS、LC-MS) などにより遺伝子機能解明の支援を行う。

1.b フェニルプロパノイド代謝の遺伝子アノテーション

機能未同定の酵素や転写因子をコードしている遺伝子、未アノテーション遺伝子などをリストアップし、本年度はそれらに関する生物学的試料 (形質転換シロイヌナズナ等) の準備を行った。

1.c 脂質代謝に関する遺伝子アノテーション

本年度は、公開されている遺伝子発現情報をもとに、高 CO₂ や高温条件下で脂質代謝に寄与する遺伝子群をリストアップした。また、植物にストレス処理を施す条件を検討した。

2. 植物代謝物アノテーション

2.a NMR を基盤とした代謝物アノテーション

UPLC-MS-SPE-NMR に関しては米国側が主導的に研究を推進し、日本側はプローブセッティングの研究技術支援を行う。オフラインの NMR に関しては日本側が主導的に研究を推進する。また、シロイヌナズナを中心としたモデル植物における単離・構造決定による代謝物同定は既採用のポスドク 1 名が推進する。次年度から既存の抽出物を用いて検討を開始する。

2.b 安定同位体ラベルと MS を用いた代謝物アノテーション

本年度は解析に必要なソフトウェア (スクラム社 CoMet) や安定同位体 (¹³C、¹⁵N、³⁴S) ラベルされたシロイヌナズナの整備を行った。また、それらを用いた LC-QTOF-MS によるメタボローム分析を行い、安定同位体ラベルピークの網羅的取得を目指した予備試験を行った。

2.c 組換え体植物での生物学的考察にもとづいた代謝物アノテーション

本年度はノーブルからかずさへのタルウマゴヤシ (野生型) の供与が行われた。現在、種子を増やしており、今後かずさから理研への譲渡が行われる。次年度以降、それを用いてメタボローム解析パイプライン (GC-MS、CE-MS、LC-MS) による代謝物アノテーションを進める。

2.d マススペクトルなど植物メタボロームの解析基盤リソース開発と充実

次年度以降、理研が保有している希少アルカロイド標準化合物に関して MS/MS データを LC-FT-MS 及び LC-QTOF-MS にて取得し、植物特異的代謝物ライブラリーへ公開し、充実を図る。また、Leibniz Institute of Plant Biochemistry の Steffen Neumann 博士との共同研究により公共データベース (MetFrag および MassBank) を用いたシロイヌナズナにおけるアノテーションの充実を推進する。

「千葉大」グループ (研究機関別)

本研究グループは、代謝に関連する遺伝子と代謝物の生物学的アノテーションを担当し、植物体内での炭素分配に関する植物特異的代謝に関連する新規遺伝子の生化学的および生物学的機能を同定することを目的とする。具体的には、特定の外来遺伝子を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体について、推定される遺伝子機能やネットワークなどの生物学的考察とフェニルプロパノイド、テルペノイドなどの代謝物変動解析にもと

づいて、ホストのシロイヌナズナにおける代謝物アノテーションを行う。本研究で代謝エンジニアリングに必須の植物特異的代謝の制御機構の分子基盤が明らかにされることが期待される。

平成 23 年度は、1. b、1. c および 2. c 項目について以下の研究を実施した。

代謝変動に関連すると予測される特定の外来遺伝子(酵素、転写因子など)を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体の作製を行った。まず、代謝物アノテーションと生物学的アノテーションに用いるシロイヌナズナ変異体の育成のため、医薬系総合研究棟5階の人工気象室内に植物育成棚2台および培養棚1台を設置した。

シロイヌナズナをホストとして用い、機能未同定の酵素、転写因子、未アノテーション遺伝子などを導入した変異体を作製および導入遺伝子の選択を行った。具体的には、異所発現変異体として、*Perilla frutescens*(シソ)由来のアントシアニン生合成を制御する MBW (myb-bHLH-WD40)転写因子複合体を導入したシロイヌナズナ変異体、*Lupinus angustifolius*(ホソバルピナス)由来リジン脱炭酸酵素を導入したシロイヌナズナ変異体を作製した。また、シロイヌナズナ内在性代謝関連遺伝子としてリプレッサードメインをもつ転写因子の絞り込みを行った。

「かずさ」グループ(研究機関別)

2.b 安定同位体ラベルと MS を用いた代謝物アノテーション

本研究グループは、植物メタボロミクス研究に現在求められている最も重要な課題である代謝物の化学的アノテーションを担当し、安定同位体気流(主に酸素の安定同位体)の投与研究と超高分解能 FT-ICR-MS を組み合わせて、正確な元素組成を元にした代謝物アノテーションの効率化および精密化を図ることを目的として、本年度は以下の研究内容を実施した。

具体的には、マメ科植物タルウマゴヤシの化学的アノテーションは米国側(ノーブル研究グループ)と情報の提供での相補的連携を行う必要があるため、ノーブル研究グループからゲノム解読が報告されたモデルマメ科植物タルウマゴヤシ(Jemalong A17)の種子を入手した。本年度は酸素の安定同位体を発注納品し、タルウマゴヤシの栽培可能な環境整備と栽培条件の検討を行った。タルウマゴヤシ(Jemalong A17)の種子の芽生えなどの条件検討は、ノーブル研究グループのサイト(<http://www.noble.org/MedicagoHandbook/index.html>) の *Medicago truncatula* handbookの中のSeed storage and germinationに従って行った(図1)。



図1 タルウマゴヤシ
(*Medicago truncatula* Jemalong A17)

また、安定同位体ラベルによる超高分解能 FT-ICR-MS の分析条件に関しては、本研究グループが科研費などの研究で進めてきた同じマメ科植物ミヤコグサの分析条件結果(図2)を適用する予定である。

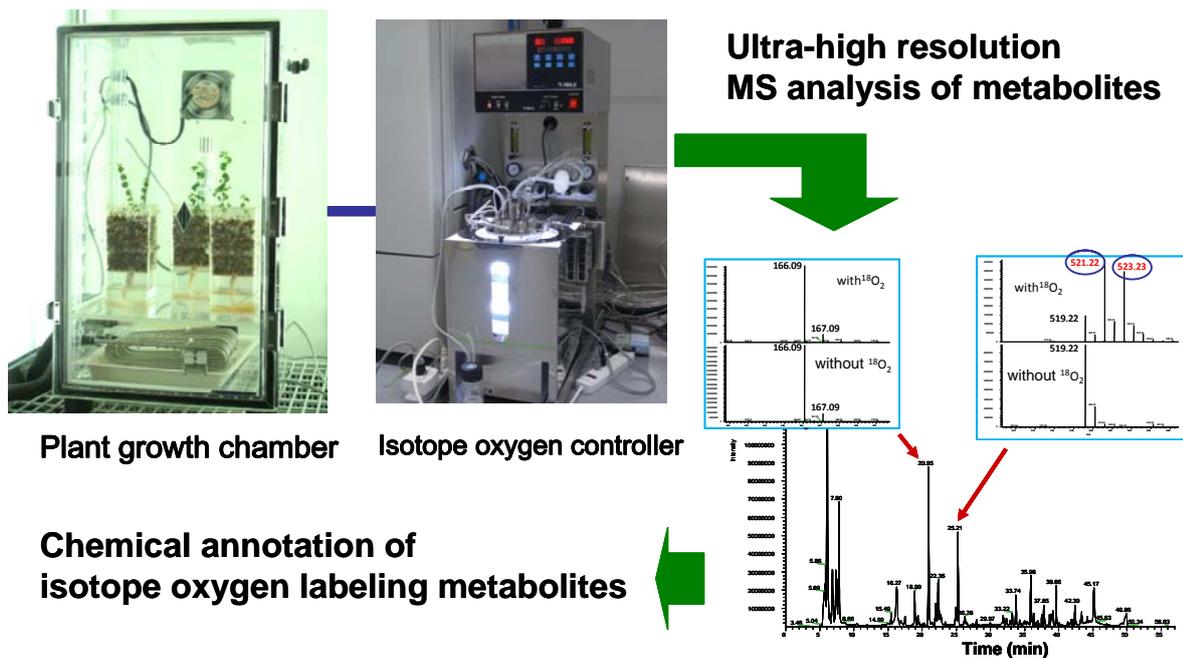


図2 ミヤコグサを用いた安定同位体酸素の投与および精密質量の取得

2.c 組換え体植物での生物学的考察にもとづいた代謝物アノテーション

代謝物アノテーションの効率化および精密化を図るためには、標準化合物の分析データは相補的役割を担うと考えられるので、各研究グループの保有している標準化合物のリストを相互に情報提供することが日米合同キックオフミーティングでの本研究グループ内で決議された(平成23年2月17日)。本年度は日本国内で購入可能で、本研究グループがすでに保有している1034種類の標準化合物のリストを整理し、理研グループに提供した。また、特定の外来遺伝子を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体での生物学的考察にもとづいて、シロイヌナズナにおける組織的な代謝物アノテーションを進めるため、本年度は理研グループおよび千葉大グループと情報交換を行った。

4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

① 発表総数

なし

② 論文詳細情報

(4-2) 特許出願

① 平成 23 年度特許出願内訳

なし

② 本事業での研究期間累積件数

なし

(4-3) 国際学会および主要な国内学会発表

- ① 招待講演
なし
- ② 口頭講演
なし
- ③ ポスター発表
なし

(4-4) 受賞等

- ① 受賞 なし
- ② 新聞報道 なし
- ③ その他の成果発表 なし

(4-5) その他特記事項

なし

5. 主催したワークショップ等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H24.2.17	Joint-program with JST-NSF “Metabolomics” Meeting	ヒルトン成田エア ポートホテル	60 (17)	本プログラムの全 体計画の策定お よび試料の交換 など実質的な共 同研究の議論を 行った。
H24.2.18~19	Metabolome Informatics Workshop	ヒルトン成田エア ポートホテル	48 (14)	特に、メタボロミク スインフォマティ クスについて、メ タデータの内容と 公開など基本的 事項を議論した。

()内はグループの参加人数

6. 学生・研究者の派遣、受け入れ等

(派遣)

なし

(受け入れ)

受入者：大学院博士課程1年次学生(千葉大学) 1名

受入先：理化学研究所

受入期間：2011年12月1日～2012年3月31日(91日)

以上