

(平成 26 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「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26年度実施報告書

研究代表者

氏名

斉藤 和季

所属

国立研究開発法人 理化学研究所 環境資源科学研究センター

役職

副センター長・グループディレクター

1. 原著論文発表

(以下の記載要領にしたがって、平成 26 年度の論文実績について記載してください。)

1-1. 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 6 件	(1 件)
計 6 件	(1 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

1. Atsushi Fukushima, Miyako Kusano, Ramon Francisco Mejia, Mami Iwasa, Makoto Kobayashi, Naomi Hayashi, Akiko Watanabe-Takahashi, Tomoko Narisawa, Takayuki Tohge, Manhoi Hur, Eve Syrkin Wurtele, Basil J. Nikolau and Kazuki Saito, “Metabolomic Characterization of knock-out mutants in Arabidopsis - Development of a metabolite profiling database for knock-out mutants in Arabidopsis (MeKO)”, *Plant Physiology*, **165**, pp.948-961, May 2014 (DOI: 10.1104/pp.114.240986) 米国 Nikolau チームとの共著論文
2. Zhigang Yang, Ryo Nakabayashi, Yozo Okazaki, Tetsuya Mori, Satoshi Takamatsu, Susumu Kitanaka, Jun Kikuchi and Kazuki Saito, “Toward better annotation in plant metabolomics: Isolation and structure elucidation of 36 specialized metabolites from *Oryza sativa* (rice) by using MS/MS and NMR analyses”, *Metabolomics*, **10**, pp.543-555, August 2014 (DOI: 10.1007/s11306-013-0619-5) 本論文が掲載される巻号の表紙絵に採用された
3. Kota Kera, Yoshiyuki Ogata, Takeshi Ara, Yoshiki Nagashima, Norimoto Shimada, Nozomu Sakurai, Daisuke Shibata and Hideyuki Suzuki, “ShiftedIonsFinder: A standalone Java tool for finding peaks with specified mass differences by comparing mass spectra of isotope-labeled and unlabeled data sets”, *Plant Biotechnology*, **31**, pp. 269-274, August 2014 (DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0609c)
4. *Keiko Yonekura-Sakakibara, Ryo Nakabayashi, Satoko Sugawara, Takayuki Tohge, Takuya Ito, Misuzu Koyanagi, Mariko Kitajima, Hiromitsu Takayama and Kazuki Saito, “A flavonoid 3-O-glucoside:2”-O-glucosyltransferase responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana*”, *The Plant Journal*, **79**, pp. 769-782, September 2014 (DOI: 10.1111/tpj.12580) シロイヌナズナにおいて、花粉特異的フラボノイドの構造を決定し、関連する配糖化酵素遺伝子を機能同定した
5. Tobias Kind, Yozo Okazaki, Kazuki Saito and Oliver Fiehn, “LipidBlast templates as flexible tools for creating new in-silico tandem mass spectral libraries”, *Analytical Chemistry*, **86**, pp. 11024-11027, 2014 (DOI: 10.1021/ac502511a) 米国 Fiehn チーム (有田-Fiehn チーム) との共著論文
6. Fumio Matsuda, Ryo Nakabayashi, Zhigang Yang, Yozo Okazaki, Jun-ichi Yonemaru, Kaworu Ebana, Masahiro Yano and Kazuki Saito, “Metabolome-genome-wide association study dissects genetic architecture for generating natural variation in rice secondary metabolism”, *The Plant Journal*, **81**, pp. 13-23, January 2015 (DOI: 10.1111/tpj.12681)

② 未発行論文数

(受理前のものは含めないでください。受理後、掲載巻・号・ページ等が未定の場合は“accepted”、決定しているものは“in press”と付記してください。)

(平成 26 年度 研究実施報告)

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

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

1. Yozo Okazaki, Tomoko Nishizawa, Kouji Takano, Miwa Ohnishi, Tetsuro Mimura and Kazuki Saito, “Induced accumulation of glucuronosyldiacylglycerol in tomato and soybean under phosphorus deprivation”, *Physiologia Plantarum*, March 2015 (DOI: 10.1111/ppl.12334) (accepted)

A 終了報告書

研究課題	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
日本側研究代表者(所属組織)	斉藤和季(理化学研究所)
アメリカ側研究代表者(所属組織)※カタカナ	ロイド・W・サムナー(サミュエル・ロバーツ・ノーベル財団)
前期支援期間	H23年12月-H27年3月
日本チームの研究費(直接経費)	144,660,000円

日本チームの主たる共同研究者(研究担当者/組織名)	山崎真巳(千葉大学)
	鈴木秀幸(かずさDNA研究所)

飛躍的に発展するメタボロミクス研究による低炭素社会実現に向けた植物特異的代謝解明に資する基盤研究の推進

プロジェクトの目的と課題

植物メタボロミクス研究の重要課題である化学的・生物学的アノテーションを向上させる取り組み

メタボロミクスは物質代謝と遺伝子機能を解明する革新的なシステム生物学の一つである。メタボロミクスの有用性は広く認められているが、いまだいくつかの技術的な課題が残されているため、その科学的な期待に十分答えられているとはいえない。これらの課題とは全代謝物の構造を推定する化学的アノテーションとそれらを遺伝子およびタンパク質機能に関連づける生物学的アノテーションである。本国際共同チームは低炭素社会に向けた植物特異的代謝の解明に資する基盤研究を推進するために、2つの課題に対して統合的な研究手法で取り組む。炭素分配に大きく寄与するフェニルプロパノイド代謝およびエネルギーを豊富に蓄えた脂質代謝を生物学的目標に選び、鍵遺伝子の機能解析に対して最先端メタボロミクス研究手法を用いて取り組む。このためには、モデル植物であるアブラナ科シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)やマメ科タルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)を中心に、これまで未知としてしか扱うことが出来なかったピークに代謝物情報を付与すること、代謝物網羅性の向上、条件別な代謝物分布の解明などを通じて、植物特異的代謝の理解をより一層深める必要がある。二つの生化学的な物質群(フェニルプロパノイドと脂質)は、生物学的に最も大きなバイオマスおよび還元型炭素分配物質である。従ってこの代謝メタボロミクス研究の発展は、植物における炭素分配を介してエネルギー問題解決と低炭素社会の実現に大きく貢献する。

用いた技術、手法

メタボロミクスの研究推進に資する代謝物アノテーションを行うための技術的課題克服に向けた取り組み

本プロジェクトでは、未だ同定されていない植物代謝物のアノテーションを強力に推進するための基盤整備を進めた。高速液体クロマトグラフィーにフーリエ変換型イオンサイクロトロン共鳴質量分析 (FT-ICR-MS) を組み合わせた超高精度な装置を用いて、炭素や窒素、酸素、硫黄の安定同位体でラベルした植物体サンプルを測定し、正確な質量電荷比をもとにした元素組成と代謝物アノテーションの効率化および精密化を進めた。同様に、Orbitrap 型質量分析計を用いて解析し、安定同位体ラベルピークの抽出ソフトウェア (ShiftedIonsFinder) の開発を行った。アノテーションピークの主要なものについては高速液体クロマトグラフィー質量分析装置に固相抽出カラムと核磁気共鳴法を取り入れた UPLC-MS-SPE-NMR 装置 (米国) で調べた。日本では質量分析計に加えてオフラインによる高分解能 NMR を用いた代謝物アノテーションのプラットフォームを構築し、特異的代謝物を単離・構造決定した。高速液体クロマトグラフィーに四重極型飛行時間型質量分析 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) を組み合わせた装置を用いた脂質を網羅的に解析する「脂質メタボローム解析」を整備した。最新鋭のガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) による測定を加えることによりメタボローム解析パイプラインで測定可能な化合物の範囲を広げ、バックアアウト変異体のメタボロームデータベース (MeKO) の構築を行った。

研究成果と社会的インパクト

FT-ICR-MS の優れた検出ピーク分解能を利用した、植物の含硫黄代謝物を網羅的に測定する「S-オミクス」を報告した。メタボロームのデータから含硫黄二次代謝物イオンの組成式や構造式の解析が可能になり、植物が生み出す有用代謝物の効率的な発見に貢献すると期待される。脂質メタボローム解析を用いて、リン欠乏環境下で生育したシロイヌナズナにおける膜脂質のリモデリングを調べた。その結果、リン欠乏時に特異的に誘導される新規植物糖脂質「グルクロン酸脂質 GlcADG」を発見し、その生合成経路と遺伝子 *sqd2* を同定した。この物質の多様な植物でのリン欠乏ストレス緩和機能を明らかにした。また、シロイヌナズナにおいて花粉特異的フラボノイドの構造を決定し、関連する配糖化酵素遺伝子 (UGT79B6) を機能同定した。フラボノイド制御因子 (MYB12、PAP1) 過剰発現植物と生合成酵素遺伝子欠損変異体の交配により作出した種々の植物体の精密なメタボローム解析を行うことにより、フラボノイドと植物の環境ストレス耐性の関係を明らかにした。日本で栽培されているイネ 175 品種の二次代謝産物に注目したメタボロームのゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、例えばフラボノイド-O-配糖体の含有量は 6 番染色体上の SNP の遺伝型に強く影響を受ける事を示した。有用代謝物を多く含む新品種の育種技術を短期間で開発することにつながると期待される。

アメリカチームとの相乗効果に基づく特記成果

日本から米国へは、シロイヌナズナフラボノイド生合成酵素遺伝子ノックアウト体の解析、脂質関連遺伝子の機能同定のためのリポドミクス解析、MeKO データベースと ShiftedIonsFinder ソフトウェア、LC-FTICR-MS を用いた代謝物アノテーションを提供した。安定同位体ラベルした代謝物のアノテーションを行うプラットフォームの構築、未知代謝物のアノテーションと植物代謝物ライブラリーの充実、実測定のデータベースへの登録は、日本側と米国側が持つ代謝物アノテーション情報を交換することで、相互補完的に発展させた。日本側から若手研究員を数週間米国側に派遣して主に UPLC-MS-SPE-NMR 装置を使った共同研究を進めた。相手国との相乗効果を高めるために、日米間の Web 会議システムでの推進会議を隔月に行い、若手研究員が発表し研究交流を活発にした。毎年合同ワークショップを開催し、チーム間の連携を強化した。従来それぞれの国の個別研究では実現できなかった、植物材料の準備や、最先端メタボローム解析装置の利用、バイオインフォマティクス手法などを両国間で組み合わせることにより、低炭素社会の実現に資する基盤研究を効率的に進展させた。

研究成果物

本プロジェクトで得られた研究成果は、科学的成果物として 13 報の原著論文を査読審査のある国際誌に発表した。例えば、リン欠乏時に特異的に誘導される新規植物糖脂質を発見した結果は Nature Communications 誌に発表した。FT-ICR-MS の優れた検出ピーク分解能を利用した「S-オミクス」は Analytical Chemistry 誌に発表した。最新の結果のいくつかについては国際学会等で公表したので、現在論文を準備している。また、査読審査のある総説および成書の一章として国際誌に 12 報、国内誌に 2 報を発表し、メタボロミクス研究に現在求められている代謝物アノテーションの概要とメタボロームデータベース、代謝物蓄積と遺伝子発現の共発現性を用いた統合解析について報告した。さらに 3 つのデータベースと 1 つのソフトウェアを Web 上に公開した。その中で MeKO データベースは Plant Physiology 誌へ発表し、含まれる質量分析データを相手国チームの植物メタボロミクス・トランスクリプトミクスデータベース PMR から閲覧可能とした。これらの試みは、代謝物情報を公共利用可能にし、関連分野の進展を促す基盤リソースの一つとなると期待される。その過程で課題となる質量分析のデータベースを世界で標準化するための議論がメタボロミクスの国際学会などで行われた。

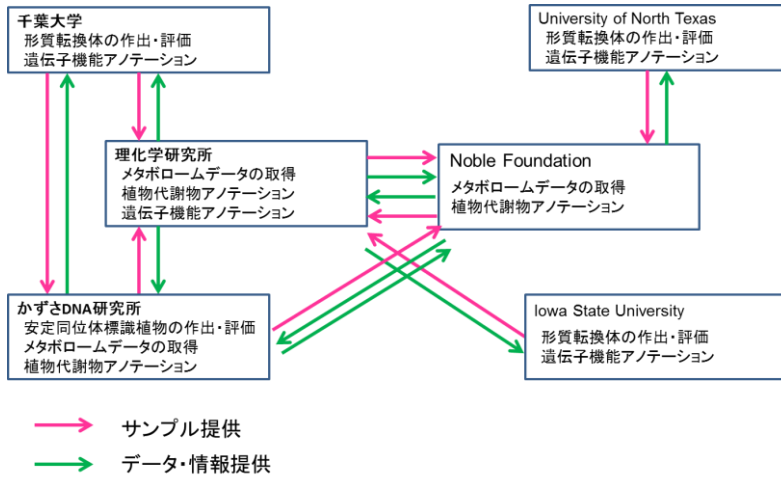


図: 日本—米国間の研究実施体制の模式図

FINAL REPORT (DIGEST FOR PUBLIC)

Project Title	Metabolomics: Advancing the Scientific Promise to Better Understand Plant Specialized Metabolism for a Low-Carbon Society
Research Leader in Japan (Organization)	Kazuki Saito (RIKEN)
Research Leader in the U.S. (Organization)	Lloyd W. Sumner (The Samuel Roberts Noble Foundation)
First Funding Period	Dec. 2011 – Mar. 2015

List of Co-researchers	Mami Yamazaki (Chiba University)
	Hideyuki Suzuki (Kazusa DNA Research Institute)

Main Title

Metabolomics to better understand plant specialized metabolism for a low-carbon society

General Objects and Main Issues

Systematic and biologically driven annotation of the Arabidopsis and Medicago metabolomes using sophisticated novel approaches to propel the scientific promise of metabolomics

Metabolomics is a revolutionary systems biology tool for understanding metabolism and elucidating gene function. Although the vast utility of metabolomics is well documented in the literature, its full scientific promise has not yet been realized due to multiple technical challenges. These challenges include the accurate chemical identification of metabolites and a sophisticated understanding of the spatial/temporal distribution of metabolism. To address these issues and to meet the goals of the JST-NSF Metabolomics program, a synergistic international team of plant metabolomics and metabolism experts has used an integrated approach that unites clear biological drivers to both push key technical developments and then pull from these enabling technologies a better understanding of carbon sequestration and allocation in relationship to energy and a low carbon society. More specifically, this project has sought two major aims: 1) Functional genomics for plant specialized metabolism (cell wall, phenylpropanoids and lipids) in the model organisms *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*, 2) Advancing metabolite annotation capacity to significantly improve the depth-of-coverage and the biological context of metabolomics leading to enhanced understanding of plant metabolism.

Methods and Technologies

Advancing metabolite annotation capacity to significantly improve the depth-of-coverage and the biological context of metabolomics

The need to confidently identify and accurately annotate unknown peaks in untargeted metabolite profiles is one of the most challenging issues in the current metabolomics. The strategy of combining the ultra-high resolution capabilities of LC-FTICR-MS with stable-isotope labeling is most promising to advance the issue of peak annotation. We have established a novel workflow of the comprehensive annotation for sulfur-containing metabolites, so-called 'S-omics'. Stable isotope-labeled materials have been also subjected to LC-Orbitrap-MS analysis for peak annotation. A novel JAVA-based software program named 'ShiftedIonsFinder' has been developed for efficiently dealing isotope-labeling of MS peaks. In the US, the automated UPLC-MS-SPE-NMR technology has been established. In Japan, the combined isolation and analytical pipeline using a preparative LC-PDA-MS followed by high-performance NMR for specialized plant metabolites has been established. This workflow has been applied to the isolation and structure determination of 36 rice metabolites. The RIKEN team has established a lipidomic analytical pipeline using UPLC-IT-TOF-MS. These technologies advanced the better chemical annotation of unknown peaks from plant materials. For an efficient hypothesis generation in functional genomics study, a database named 'MeKO' has been developed, in which 50 Arabidopsis mutants were chosen and analyzed by GC-MS.

Results and Social Impacts

The gene encoding a novel glucosyltransferase (UGT79B6) responsible for terminal modification of pollen-specific flavonols in *Arabidopsis thaliana* was identified. This process was accomplished by unequivocal structural identification of flavonoids from the pollen. *In vivo* function of flavonoids as antioxidants was elucidated by metabolome analysis of a series of transgenic plants expressing combination of transcription factors (MYB12, PAP1) regulating the biosynthesis of flavonoids. This result indicated the usefulness of flavonoids for protecting crops from the global warming caused by CO₂ emission. Metabolome-genome-wide association study was conducted by analyzing the aerial part of 175 Japanese diverse rice cultivar seedlings using LC-MS/MS. The results revealed the genetic architectures for generating the diversity of secondary metabolites (e.g. flavone-C-glycosides) in rice. This strategy would be useful for future crop improvement of a low-carbon society. Using the lipidomic pipeline, extensive lipid profiles were obtained for the Arabidopsis plants subjected to environmental stresses including phosphorus starvation. These analyses led to the discovery of a novel lipid class in plants, called GlcADG, that was induced undergoing phosphorus starvation. One of the key genes responsible

for the biosynthesis of GlcADG was identified, called *sqd2*. Using the Arabidopsis mutants, the protective function of GlcADG against phosphorus depletion was elucidated.

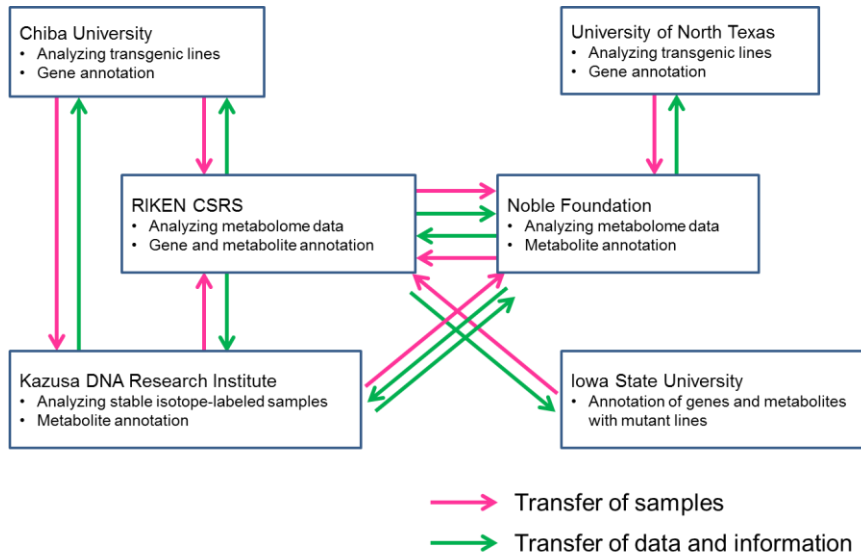
Synergies between US and Japanese Teams

The Japan teams offered to the US teams isolation and characterization of an Arabidopsis flavonoid mutant (*tt10*), analytical lipidomic platform, database and software (MeKO, ShiftedIonsFinder), and LC-FTICR-MS analysis. Through the collaboration of the US and the Japan teams, metabolite annotations using the stable isotope-labeled materials, systematic effort on peak annotation, metabolite library construction, and MS databases have been developed. Japanese postdoctoral researchers visited the US teams and conducted collaborative researches using UPLC-MS-SPE-NMR. Every two months, all project members joined via a video-meeting to discuss the scientific progress and future plans. Several young researchers from both sides gave short presentations on their research progress, with followed by an exchange of questions and answers. We've also held four face-to-face project workshops, in which most of project participants joined and discussed research; in some cases these workshops brought together different teams funded by the JST-NSF METABOLOMICS program.

Achievements

During the funding period, 13 original papers were published in peer-reviewed international journals. For instance, the determination and characterization of GlcADG from plants was published in *Nature Communications*. The comprehensive annotation for sulfur-containing metabolites was published in *Analytical Chemistry*. Some latest results have already presented at international conferences. We also reported 12 review papers in international journals and book chapters, in which we discussed overviews of metabolite annotations, metabolome databases, and integrated metabolomics/transcriptomics analyses. Three databases and a software program have been developed and available on websites. The MeKO database was published in *Plant Physiology*, and partially consolidated with a US metabolomics/transcriptomics database as the first international data sharing efforts. We have joined discussion of the on-going efforts with the internationally-recognized metabolomics databases.

Illustrations



A diagram showing the organization of the Japan-US joint research project.