

## 研究主幹総評および領域活動概要

### I. 評価の概要

対象領域：戦略的国際共同研究プログラム（SICORP）

日本-アメリカ共同研究「低炭素社会のためのメタボロミクス」

対象期間：2011年12月～2017年3月末日

### II. 研究主幹総評

4つの研究課題について研究成果をまとめる。

「研究課題1」は、代謝物の識別子として化学構造を圧縮表現する InChI key を用いて、主要な14データベースに登録されている代謝物の化学情報を統合した。マスマスペクトルや NMR スペクトルのデータ圧縮表現 SPLASH を米国チームらと共同で開発した。これらの統合データベースは公開されて、既に世界的に利用されている。メタボローム解析に利用するソフトウェアとして、MS/MS で測定されたマスマスペクトルのうち同一代謝物に由来するピークを見つける MS-DIAL や、LC の保持時間と部分化学構造に特徴的なピークから代謝物の化学構造を推定する MS-FINDER を、いずれも米国チームと共同で開発した。これらは質量分析情報科学ともいえるべき、新しい研究分野が日本で誕生する契機となった。

光合成微生物のゲノムや遺伝子の配列と機能などを収集したデータベースを新たに構築した。これらを活用して光合成原生動物 *Euglena gracilis* を対象として、メタボローム解析、RNA-seq、<sup>13</sup>C 代謝流束解析をおこなって、炭素利用の最適化をおこなった。*E. gracilis* によるワックスエステル合成は、嫌気条件下では転写レベルの変動を伴わないで合成を開始し、低酸素条件下では還元的 TCA サイクルを利用して無機の CO<sub>2</sub> を合成に利用する、新しい代謝活動を発見した。この発見は、*E. gracilis* の産業的利用の新しい可能性を拓いたものである。

「研究課題2」は、世界トップクラスの高分解能質量分析を用いて、検出した代謝物質は多様性において、それらの化学構造情報の密度と量において、メタボローム解析における最高の到達点を示した。脂質を対象にしたメタボロミクス（リピドミクス）とシロイヌナズナ変異体のライブラリーを用いて、リン欠乏ストレス条件下では、リン脂質の新しいリモデリング現象が生じていることを発見し、その現象の背景となっている分子生物学的機構を明らかにした。この現象は、イネ、トマト、大豆においても観察されたことから、リン欠乏ストレスに対する植物に共通な耐性機構の一つであることを、うかがわせる大きな発見となった。

さらに、シロイヌナズナに存在している、硫黄原子を含む全代謝物の検出

(S-omics) に成功した。この方法は硫黄に限らず、窒素や酸素などのヘテロ原子を含む代謝物の網羅的検出に応用することができる。この技術を応用してアスパラガスから薬理活性を有する新規代謝物アスパレプチンを見つけ、ニチニチソウからは窒素原子を含む代謝物 32 化合物の化学的注釈をおこなって、この技術の有効性を実証した。世界の多くの研究室でこれに準じた高分解能質量分析がメタボローム解析に用いられていることを考慮すると、日本チームが開発した測定技術は広い分野で利用されるものと期待される。また、シロイヌナズナなどのメタボロミクス関連データベースに多くのデータを蓄積するなど、データベースにおいても日本チームは国際的に貢献した。

「研究課題 3」は、モデル微生物である大腸菌と光合成細菌 *Synechococcus* を用いた、次世代のバイオ燃料である 1-ブタノールの生産性向上を目的として研究をおこなった。日本チームが 1-ブタノール生産株大腸菌のメタボローム解析と代謝流束解析をおこない、米国チームがこれらの測定データにもとづいて酵素反応モデルを構築（アンサンブルモデリング）して改良点を見つけ出し、日本チームが生産株に改良を加えて、さらに生産量が向上した生産株を作出する、という一連の研究サイクルを大腸菌に応用することに初めて成功した。日本チームと米国チームがそれぞれの分担を決めて、互いに技術的に補完することによって、生物工学および関連分野における技術革新をもたらした。

日本チームは、メタボロームと代謝流束を解析するために必要なソフトウェアを開発した。メタボローム測定で得られたデータの処理をおこなうソフトウェアとして MRMPROBS や MRM-DIFF、AIOutput を開発した。また、代謝流束解析（MFA）の中核となるソフトウェア OpenMebius はグルコースなどの炭素源の一部を  $^{13}\text{C}$  同位体で標識して培養した細胞の同位体分布を対比、解析することによって  $^{13}\text{C}$ -MFA を精度良くおこなうことができる汎用性の高いものである。これらのソフトウェアは公開されているので、生物工学分野で国際的に貢献するものと期待される。

「研究課題 4」は、イネ 3 栽培品種にジャスモン酸（JA）を処理して、日本晴れにだけ誘導された二次代謝物代謝物を (3R)- $\beta$ -チロシンと同定した。量的遺伝子座（QTL）解析によって、日本晴れ 12 番染色体上の約 100 遺伝子群の中にチロシン 3 アミノ転移酵素（TAM1）の遺伝子を見つけ、発現した TAM1 タンパク質が  $\beta$ -チロシン合成活性を有することを実験的に証明した。 $\beta$ -チロシンは日本晴れの根から分泌され、双子葉植物の根の伸長を抑制していた。さらに日本晴れとカサラス種間でサクラネチンの生合成比が異なることや、ダイズが食害を受けたときに誘導するイソフラボン類のいくつかを化学的に明らかにした。また、トウモロコシは病気に感染すると death acids と呼ばれる二次代謝物を蓄積することを植物で初めて見つけた。これらは生合成経路や生理活性が

ジャスモン酸類に似ているだけでなく、細胞死活性を有していることも見つけた。

以上のように4研究課題は、メタボロミクス研究にとって必要とされていた、ハイスループットかつ網羅的な代謝物の検出・同定、生物学的注釈づけという課題に対して、研究課題1、2、3は質量分析学と情報科学を基礎として、また研究課題4は遺伝子同定の迅速化を基礎として、それぞれ異なる視点からアプローチした。

研究課題1、2、3はいずれも、質量分析学および情報科学に基礎をおいた、新しい基盤技術の開発とデータベース構築に、研究期間を通してまじめに取り組んできた。これらの技術やデータベースは、いずれも近年の高分解能ハイブリッドタンデム型質量分析の能力を十分に引き出すことに成功している。このことは、学術論文や国際学会での発表の数、でも裏付けられている。研究課題4は、日本チームがこれまでに構築してきたイネの染色体断片置換系統と組替え自殖系統、を利用して、遺伝子同定をきわめて効率的に実施することによって、質量分析で検出された代謝物の同定と生物学的注釈を迅速におこなう実験系を確立した。これら4研究課題の研究開発成果は、メタボロミクスを利用する研究や応用に留まらず、質量分析を利用したハイスループットな研究や作物の育種への応用に、広範囲に利用されることが期待される。

これらの技術は、光合成を利用する生物によるCO<sub>2</sub>固定能力を最大限に引き出して、有用物質を生産する、あるいは、病虫害抵抗性作物の育種をおこなう、という4研究課題がそれぞれ目指した課題を達成するために、開発した技術を十分に活用するには研究期間が足りなかった。これは、研究課題が対象とした光合成生物はいずれも比較的良好に研究されているとはいえ、モデル植物と比べると、その代謝についての過去の研究の蓄積がとて少なかったことが原因であった。例えば、研究課題1では、光合成微生物全般について、これまでに研究された代謝に関するデータベースを構築したが、固定されたCO<sub>2</sub>が脂質代謝に取り込まれる代謝経路やその制御に関する知見が、予想以上に乏しかった。また、研究課題4では、新規代謝物の生合成酵素遺伝子の同定はハイスループット化を実現したものの作物の新品種開発の例を示すにはいたらなかった。

本SICORPとしての研究成果、すなわち4研究課題の研究成果、は網羅的ともいえる代謝物の分離・同定から、それらの生合成に関与している酵素遺伝子の同定、遺伝子座の決定までを、ハイスループットかつ迅速におこなう「次世代のメタボロミクスを実現した」、と表現できるであろう。

研究課題 1 と 2 によって、研究の対象とする代謝物クラス（例えば、脂質、フラボノイド、硫黄原子を含む全代謝物など）とクラス内にある代謝物を高密度あるいは網羅的（S-omics や N-omics）に検出することと、化合物同定の信頼性が大きく改善された。さらに、研究課題 3 によって、代謝流束の解析法を実現したことによって、細胞間や細胞内で CO<sub>2</sub> 由来の炭素原子が様々な代謝物に変換していくダイナミックな同化の過程を、短期間に高い精度で定量的に測定する技術が実現した。研究課題 4 によって、新規代謝物の生合成酵素遺伝子とその染色体上の遺伝子座を、迅速に同定することが可能になった。

これらの研究成果は、ヒトをはじめとする生物がかかわる現象、実用的には医療や農業、生物を利用した物質生産、作物の新品種の育種、などの広い分野で応用されるだろう。とりわけ、地球温暖化に関して、CO<sub>2</sub> 削減をおこない、低炭素社会の実現に、大きく貢献できると考えられる。

次に、日米間の共同研究によって、どのような相乗効果が生まれて、研究成果に反映したのか、について考察しておく。研究成果はそれぞれ査読付きの国際的な学術雑誌に論文や総説として発表された。論文の数は 23～35 編（研究課題 4 は 7 編）とばらつきはあるものの、いずれの研究課題においても日米共同研究チームが共著として公表した論文は、それらのうち 3 編または 4 編、（研究課題 4 は 6 編）であった。このことから、日米共同研究チームの協力が足りなかった、相乗効果が少なかったと、判断してはならない。

研究課題ごとに、日米間でインターネットを利用して定期的にビデオ会議を開いて、進捗状況について報告と意見の交換をおこなった。お互いの研究目的や進展状況を理解しているので効果的な議論がおこなわれた。4 研究課題はいずれも独立に実施されたが、日米共同研究チームのほぼ全員が、毎回参加したワークショップやシンポジウム（毎年、非公開で開催）を自主的に開催して、研究課題の進行状況を共有してきた。また、質問に対しては参加者から回答や、アドバイスがおこなわれて、問題解決がはかられた。このように、プログラム内での交流が活発におこなわれ、十分に機能していた。

日本チームだけで実施することが困難であった研究を、速やかにかつ、相補的におこなって、日本チームが研究計画を進めるうえで、日本チームだけで実施したときと比べて明らかに予想以上の研究成果が得られたとき（相乗効果が得られたとき）には共著論文として発表がおこなわれた。研究課題 2 では、頻繁に意見交換がおこなわれ、異なる米国チームとの間でもおこなわれた研究成果が共著論文として発表された。研究課題 3 では、日米それぞれが自分のチームが開発した技術を提供して、互いに補完しあって、一つの研究成果に導いた共著論文が発表された。研究課題 1 では米国チームの研究室に日本チームの博

士研究員が1年間の滞在と、数ヵ月単位の滞在を複数回おこなって、得られた研究成果4編を共著論文として公表した。これら3研究課題に対して、研究課題4では、試料のLC-MS/MS分析は日本側が、バイオインフォマティクス解析はアメリカ側が実施した。発表論文7編のうち6編を日米共著論文として発表した。これらは日米共同チームの相乗効果ではなくて、むしろ日米両チームそれぞれが単独ではできなかった研究課題を半分ずつ分担して実施した共同研究の成果である。このように共同研究をすすめるスタイルの違いによって、日米両チームの共著論文の数と相乗効果かどうかの評価が異なる。

本 SICORP プログラムが日米チームに強く推奨してきたことが2つあった。

(1) 実験データのデータベース化、(2) 日米両チームの大学院生や若手博士研究員が互いに相手チームを訪問、滞在して研究をおこなう交流をとおしての人材育成、である。

これまでヒトのゲノム解析を契機として、ヒトや哺乳動物では遺伝子の塩基配列とその機能、メタボロームなどの実験データを集積したデータベースが作られてきた。これに対してモデル植物や微生物においては、これらの実験データ、とくにメタボロームデータ、の集積が遅れていて、不完全であった。本プログラムでは共同研究開始のキックオフワークショップ(2012年2月)と中間報告を兼ねたワークショップ(2013年9月)に出席したNSFの研究総括から、研究課題で得られたメタボロームなどの実験データをデータベースに収集するように強い要望があった。研究課題1では既存のマススペクトルデータベースの統合と、論文として発表されている光合成微生物の代謝遺伝子、遺伝子発現に関するデータの収集をおこなった。さらに、日本チームが測定した*E. gracilis*の嫌気条件下におけるLC-TOF-MS, GC-TOF-MS, RNA seqなどの実測データをデータベースとして(研究期間終了後になったものの)公開をした。研究課題2ではシロイヌナズナで発見した新規代謝物データを、シロイヌナズナの国際データベースAtMetExpressに追加登録し、変異株のメタボロームプロファイルデータをMeKOに、イネのデータをRIKEN PRIMEに、論文から収集したマススペクトルをReSpectに、それぞれ公開した。

本プログラムが推奨したもう1つは、大学院生や若手研究者が相手チームに訪問、滞在して研究や技術の習得をおこなう人材交流である。日米双方のPIが大学に所属する場合には大学院生の交流が積極的におこなわれ、研究課題3では5年間に延べ18人が、いずれも短期間の相互訪問をおこなって、発表やワークショップに参加した。この交流を通して彼らが本研究課題に寄与するだけでなく国際感覚を有する科学者や企業人に育つ、将来への投資として充分意義があったと評価できる。その他に特筆すべきこととして、研究課題1では、本

研究課題を契機として、共同研究分担者が所属する奈良先端科学技術大学院大学が国際オフィス米国チームが所属するカリフォルニア大学デービス校に大学間協定を結んで設置した、ことをあげておく。

#### 研究課題

1. メタボロミクス：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
2. 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
3. 1-ブタノール生産に資する新規メタボリック解析システムの開発
4. メタボロミクス：生理活性を持つ誘導性の植物代謝物の同定

表：各チームの主な成果（研究期間中に国際論文誌に発表された論文数）

日本側研究代表者名 【研究期間】	Peer-reviewed journals
研究課題1. 有田 正規 【2011年12月～2017年3月】	35 うち日米共著4
研究課題2. 斉藤 和季 【2011年12月～2017年3月】	23 うち日米共著3
研究課題3. 福崎 英一郎 【2011年12月～2017年3月】	29 うち日米共著3
研究課題4. 奥本 裕 【2011年12月～2015年3月】	7 うち日米共著6

西岡 孝明 京都大学 名誉教授

### III. 領域活動概要

時期	活動
2011年2月	公募開始
2011年12月	採択課題決定、研究開始
2012年2月	日米合同キックオフミーティング（日米全 PI、NSF 参加） 場所 成田ホテル会議室
2013年5月	中間報告会 場所 JST 東京本部別館
2013年9月	日米合同ワークショップ（日米全 PI、NSF 担当者参加） 場所 奈良県新公会堂
2014年5月～	延長評価
2014年12月	延長課題決定
2016年12月	日米合同報告会（日米全 PI、NSF 担当者参加） 場所 Arlington NSF 内 会議室
2017年3月	研究終了