

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」
平成 19 年度採択研究代表者

平井 優美

(独) 理化学研究所植物科学研究センター
チームリーダー

植物アミノ酸代謝のオミクス統合解析による解明

§ 1. 研究実施の概要

本研究では、植物のアミノ酸代謝をモデル系として、メタボローム研究の本質ともいえる代謝制御予測を行い、これを実験的に検証することを目指す。昨年度までに確立したハイスループット高速代謝産物分析系(ワイドターゲットメタボロミクス)を用いて、シロイヌナズナ遺伝子破壊株ライブラリーをはじめとする大規模バイオリソース等の代謝プロファイル解析を開始した。個別研究としては、ワイドターゲットメタボロミクスによる遺伝子機能同定を行った。また、メチオニン量の制御に着目し、代謝攪乱を起こさせたシロイヌナズナカルス代謝物分析を行い、数理モデル化に着手した。今後は、モデルと実測値の比較検討に基づく未知制御系の予測を行いたいと考えている。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「平井」グループ

- ① 研究分担グループ長: 平井 優美 ((独)理化学研究所、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - [1] ワイドターゲットメタボロミクスによる代謝プロファイル解析
 - [2] 代謝プロファイルに基づく数理モデリング
 - [3] 代謝とその制御に関わる新規遺伝子同定

(2) 「金谷」グループ

- ① 研究分担グループ長: 金谷 重彦 (奈良先端科学技術大学院大学、教授)

② 研究項目

- [1] 遺伝子破壊株ターゲット代謝産物分析データの解析
- [2] データベース構築

(3)「尾之内」グループ

① 研究分担グループ長:尾之内 均 (北海道大学大学院、准教授)

② 研究項目

- [1] *mto* 変異体のバッククロスラインの整備
- [2] メチオニン生合成制御欠損変異体のメタボローム及びトランスクリプトーム解析
- [3] メチオニン生合成に影響を与える新たな変異の遺伝学的解析

(4)「藤原」グループ

① 研究分担グループ長:藤原 徹 (東京大学、准教授)

② 研究項目

- [1] *in silico* 解析によるトランスポーター遺伝子機能予測
- [2] モリブドントランスポーターのアミノ酸代謝への関与

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

研究目的

炭素・窒素・硫黄の同化代謝系が合流し、多様な二次代謝への入り口ともなるアミノ酸代謝は、植物のみならず、アミノ酸を栄養素として摂取する動物にとっても重要な代謝である。しかし、研究の進んでいる微生物と異なり、植物においては未解明な部分が多く、生合成酵素遺伝子すら未同定の経路が多く残されている。これは遺伝学や生化学、分子生物学などの方法論のみでは植物アミノ酸代謝の解明が困難であることを意味する。本研究は、近年発展してきているメタボロミクスを中心とし、トランスクリプトミクスなど他のオミクスを組み合わせ、植物におけるアミノ酸代謝とその制御機構をシステムティックに解明することを目標とする。

研究方法

代謝制御機構の全体像を理解するためには、個別の遺伝子機能や個別の代謝経路、特定の生育条件のみに注目するのではなく、代謝全体を俯瞰する視点が必要である。本研究では、主にモデル植物シロイヌナズナを用いて、さまざまな条件下で取得されたトランスクリプトームやメタボロームの実データからの仮説構築を行う(data-driven hypothesis generation)。昨年度までに、予め測定代謝産物を特定したターゲット分析ではあるが、極めてスループットの高い分析系(ワイドターゲットメタボロミクス)を確立した。本年度は、対象化合物数の増大、測定感度の向上など技術改良

を進めると同時に、シロイヌナズナをはじめとする複数の植物の代謝物データを取得した。これにより、シロイヌナズナ機能未知遺伝子の機能予測および機能同定、代謝の数理モデル化のための基礎データ取得などを行った。

研究結果

(1) 理研グループ

公開されているシロイヌナズナ大規模トランスクリプトームデータ (AtGenExpress) を用いた遺伝子共発現解析により、メチオニンからのグルコシノレート生合成に関わる遺伝子群を推定した。これら候補遺伝子の機能破壊株のトランスクリプトーム解析およびワイドターゲットメタボロミクス解析により、メチオニンの側鎖伸長に関与する複数の酵素遺伝子 (原著論文1)、生合成中間体のオルガネラ間輸送に関わる遺伝子 (同2) の機能を証明した。また、NAIST グループが開発してメタボロームの代謝物同定に有効であることを示した代謝物データベース KNApSAcK (同3) を用い、AtGenExpress と同条件で栽培したシロイヌナズナの LC-QTOF によるメタボローム解析を行って、トランスクリプトームデータとの対応によりグルコシノレート代謝の特徴を明らかにした (同4)。

北大グループで整備しているメチオニン過剰蓄積 *mto1*, *mto2*, *mto3* 変異体のバッククロスラインについて、GC-TOFMS を用いたメタボローム解析を行い、各変異の代謝に与える影響を解析した (同6)。

また、ワイドターゲットメタボロミクスを用いて、シロイヌナズナ遺伝子破壊株ライブラリーをはじめとする大規模バイオリソース等の代謝プロファイル解析を開始した。これに先立って取得した約 2,700 種のシロイヌナズナ遺伝子破壊株 (トランスポゾンタグライン) と約 230 種のシロイヌナズナアクセスションの種子のアミノ酸およびグルコシノレート類のプロファイルデータを、昨年度に引き続き詳細に解析した。具体的には、統計学的手法や金谷らが開発したソフトウェア DPPlus (<http://kanaya.naist.jp/DPPlus/>)、Arabidopsis Gene Classifier (同5) を用いてデータの分布や相関などを調べ、遺伝子機能とアミノ酸代謝への影響の関係を解析した。NAISTグループと共同で論文発表に至った (同7)。

(2) NAIST グループ

1. 理研グループで取得した、約 2,700 種のシロイヌナズナ遺伝子破壊株 (トランスポゾンタグライン) の種子のアミノ酸およびグルコシノレート類のプロファイルデータを、昨年度に引き続き詳細に解析した。具体的には、統計学的手法や金谷らが開発したソフトウェア DPPlus (<http://kanaya.naist.jp/DPPlus/>)、Arabidopsis Gene Classifier (同5) を用いてデータの分布や相関などを調べ、遺伝子機能とアミノ酸代謝への影響の関係を解析した。理研グループと共同で論文発表に至った (同7)。

2. 昨年度作成した、シロイヌナズナ遺伝子のアノテーションやオントロジー、遺伝子産物であるタンパク質の細胞内局在などを検索するためのツール 'Arabidopsis Keyword Search' (<http://kanaya.naist.jp/arabidopsis/top.jsp>) を改良し論文発表した (同5)。

(3) 北大グループ

1. *mto* 変異体のバッククロスラインの整備

前年度に引き続き、メチオニンを過剰蓄積する *mto1*, *mto2*, *mto3* 変異体のメタボローム解析、トランスクリプトーム解析を行なうための準備として、それぞれの変異体を親株と戻し交配したバッククロスラインの整備を行なった。全ての変異体について 10 回の戻し交雑を完了した。各 *mto* 変異体のバッククロスラインはメタボローム解析に用いた(理研グループ)。

2. メチオニン生合成制御欠損変異体のメタボローム解析及びトランスクリプトーム解析

メチオニン生合成に関わるシスタチオニγγ-シントラーゼの発現制御に影響を与える *mto* 以外の変異体についても、メタボローム解析及びトランスクリプトーム解析を行い、変異による代謝および遺伝子発現への影響を解析した。

3. 新たなメチオニン生合成制御欠損変異の遺伝学的解析

シスタチオニγγ-シントラーゼの発現制御に影響を与える新たな変異について、遺伝学的マッピングを行った。その結果、第4染色体下腕に変異が位置づけられた。

(4) 東大グループ

in silico 解析によるトランスporter 遺伝子機能予測を共発現データを元に行うなどして、モリブデントランスporter のアミノ酸代謝への関与についての研究を進めることとした。本年度は既に同定していたモリブデントランスporter MOT1 の相同遺伝子 MOT2 についての解析を進め、MOT2 が根から地上部へのモリブデン輸送に関与することを示唆する結果を得た。また、MOT1 変異株を用いたトランスクリプトーム解析やメタボローム解析を行い、窒素同化に重要な硝酸還元酵素の発現が MOT1 の欠損によって大幅に高まることを見いだした。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

1. Sawada Y, Kuwahara A, Nagano M, Narisawa T, Sakata A, Saito K, Hirai MY. (2009) Omics-based approaches to methionine side chain elongation in Arabidopsis: characterization of the genes encoding methylthioalkylmalate isomerase and methylthioalkylmalate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 50:1181-90. DOI: 10.1093/pcp/pcp079
2. Sawada Y, Toyooka K, Kuwahara A, Sakata A, Nagano M, Saito K, Hirai MY. (2009) Arabidopsis bile acid:sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 50:1579-86. DOI: 10.1093/pcp/pcp110

3. Matsuda F, Shinbo Y, Oikawa A, Hirai MY, Fiehn O, Kanaya S, Saito K. (2009) Assessment of metabolome annotation quality: a method for evaluating the false discovery rate of elemental composition searches. *PLoS One*. 4:e7490. DOI: 10.1371/journal.pone.0007490
4. Matsuda F, Hirai MY, Sasaki E, Akiyama K, Yonekura-Sakakibara K, Provart NJ, Sakurai T, Shimada Y, Saito K. (2009) AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Physiol*. 152: 566-578. DOI 10.1104/pp.109.148031
5. Takahashi, H, Kawazoe, M, Wada, M, Hirai, A, Nakamura, K, Altaf-UI-Amin, M, Sawada, Y, Hirai, MY and Kanaya, S (2009) KNApSAcK gene classification system for *Arabidopsis thaliana*: Comparative genomic analysis of unicellular to seed plants. *Plant Biotechnology* 26: 509-516.
6. Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Kobayashi M, Otsuki H, Onouchi H, Naito S, Hirai MY, Saito K. Comparative metabolomics charts the impact of genotype-dependent methionine accumulation in *Arabidopsis thaliana*. in press. DOI 10.1007/s00726-010-0562-y
7. Hirai MY, Sawada Y, Kanaya S, Kuromori T, Kobayashi M, Klausnitzer R, Hanada K, Akiyama K, Sakurai T, Saito K, Shinozaki K (2010) Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolic system: metabolic profiling of large-scale bioresources. *Journal of Plant Research* 123: in press. DOI 10.1007/s10265-010-0337-2