

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。本研究で確立したハイスループット代謝産物分析系(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や作物野生種コアコレクション等の大規模バイオリソースの代謝プロファイル解析を行い、代謝物蓄積に影響する遺伝子(座)の推定等を行った。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サの代謝物分析を行い、数理モデル化を行った。現在、実測値と計算値との比較に基づいてモデルの改良を重ねており、モデルの利用による未知制御因子の予測を目指している。

§ 2. 研究実施体制

(1)「理化学研究所」グループ

- ① 研究分担グループ長: 平井 優美 (理化学研究所植物科学研究センター、チームリーダー)
- ② 研究項目
 - ・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
 - ・代謝プロファイルに基づく数理モデリング
 - ・代謝とその制御に関わる新規遺伝子同定

(2)「奈良先端科学技術大学院大学」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情報科学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・遺伝子破壊株ターゲット代謝産物分析データの解析
 - ・データベース構築

• Gillespie アルゴリズムによる代謝シミュレーション

(3)「北海道大学」グループ

① 研究分担グループ長:尾之内 均 (北海道大学大学院農学研究院、准教授)

② 研究項目

- *mto* 変異体のバッククロスラインの整備
- 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
- 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)「東京大学」グループ

① 研究分担グループ長:藤原 徹 (東京大学農学生命科学研究科、教授)

② 研究項目

- *in silico* 解析によるトランスポーター遺伝子機能予測
- モリブデ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**)。

これまでに確立したワイドターゲットメタボロミクスを用いて、シロイヌナズナをはじめとする複数の植物の代謝物データを取得し、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などを行う。また、アミノ酸代謝に攪乱がおこっているシロイヌナズナ変異体のいくつかに特に着目し、詳細なトランスクリプトーム、メタボローム解析などを行ってアミノ酸代謝制御機構の分子メカニズムの解明を目指す。

研究結果

(1) 理研グループ

九大の白石文秀教授と共同研究を開始し、バイオケミカルシステム理論 (**Biochemical Systems Theory, BST**) とその応用による代謝モデリングを開始した。多数の化学反応からなる代謝ネットワークを、代謝物濃度の非線形連立微分方程式として記述し、これを解くことで代謝ネットワークのシステムとしての特性を理解する。白石教授の開発した方法では、代謝攪乱の状態下で代謝物濃度の時間変化が分かれば上記の連立微分方程式の解を与えることができる(未発表)。ハイスループットにデータを得ることのできるワイドターゲットメタボロミクスを用いれば、約 700 種の代謝産物について代謝産物濃度の詳細な経時変化データを得ることができ、**BST** での解析は非常に有効である。具体的には、リジンおよびスレオニン添加により代謝攪乱を起こさせたシロイヌナズナカルス(北大グループの項参照)の時系列代謝産物分析をワイドターゲットメタボロミクスにより行った。この系では、アスパラギン酸族アミノ酸生合成のフィードバック抑制によりメチオニン濃度が低下するが、経時的にデータをとるとメチオニン濃度は低下後にまた上昇するという予想外の

変化を示した。現在、このデータを元に BST によりアミノ酸代謝制御システムの特性を解析している。

高速ターゲット分析法により、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ッションの種子のアミノ酸プロファイル、および二次代謝産物グルコシノレート類のプロファイルを分析した。結果は論文化し、データを公開している(原著論文2)。その結果、遺伝子破壊株群からは、20 種のタンパク性アミノ酸のうちのいずれかまたはいくつかの蓄積量が増加しているラインが 1 割程度の頻度で見つかった。このうち、*Calmodulin9* 遺伝子など、原因遺伝子(トランスポゾンタグにより破壊された遺伝子)のアノテーションが興味深いものについて、トランスクリプトーム解析を行い、原因遺伝子機能の解明を行っている。

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。いずれの変異体でもメチオニン過剰蓄積という代謝攪乱が起こっているが、他の代謝に対する影響の範囲は異なっていることがわかった(同1)。

理研グループで開発したワイドターゲットメタボロミクスを用いて取得した標品化合物のマスペクトルデータを、JST-BIRD プロジェクトとして開発している高分解能マスペクトルデータベース MassBank (<http://www.massbank.jp/ja/about.html>) から公開し、論文発表した(同3)。また、メタボロミクスが生物学研究のツールとして成熟し、幅広く利用されるようになることを目指して、様々な研究分野の研究者とも共同研究を行っている。進化ゲノム学の研究者とは、ワイドターゲットメタボロームデータ提供という形で共同研究を行い、生命の頑強性の仕組みの解明に至った(同4)(H22年8月18日プレス発表)。また、ある種の植物病原菌がシロイヌナズナに感染した際のアミノ酸由来二次代謝産物グルコシノレートの蓄積量の変化をワイドターゲットメタボロミクスで分析し、さらにグルコシノレートの欠損変異体を用いた実験などにより、植物病原菌に対するアミノ酸由来二次代謝産物の抗菌活性を明らかにした(同6)。

(2) NAIST グループ

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 DPCLUS (<http://kanaya.naist.jp/DPCLUS/>)、*Arabidopsis Gene Classifier* 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2)。

シロイヌナズナの全ゲノム遺伝子ならびに代謝物を対象とした大規模代謝シミュレーションに向けて、マルコフ過程を用いた統計的手法により代謝量変化を追跡することを目的に Gillespie アルゴリズムを基盤に代謝シミュレーションプログラムの開発を進めた。Gillespie アルゴリズムにおいては、各代謝物の分子数のいずれかが0になると反応シミュレーションができない。そこで、本研究では、各代謝物の分子数のいずれかが0になっても反応シミュレーションを行えるように改良を加えた。また、転写因子あるいは RNA ポリメラーゼなどの複数の因子によるプロモータとの相互作用

用を代謝反応に反応できるように、アルゴリズムの改良も試みた。ユーザーが使いやすくなるように GUI によるインタフェースを備えた形式で **Simple Simulation System** として構築した。本アルゴリズムは、現在報告されているシロイヌナズナにおける代謝全体においても通常のノート PC で 30 秒以内にシミュレーション結果を得ることができる。本プロジェクトの後半では、シロイヌナズナについて測定された代謝測定データを本ソフトウェアをもとにシミュレーションにより解釈を進めるとともに有用代謝物の生産性について検討する予定である。

(3) 北大グループ

理研グループと共同で、各 *mto* 変異体のバッククロスラインを用いてメタボローム解析を行い、論文発表に至った(同1)。また、各 *mto* 変異体について、バッククロスラインを用いてトランスクリプトーム解析を行い、結果を解析中である。

バイオケミカルシステム理論 (BST) による代謝システム解析を行うための実験系として、植物細胞内のメチオニン量の変動を誘導した場合に定常状態に達するまでにどのような代謝攪乱が起こるかを解析するために、メチオニン量の変動を誘導する系の確立を進めた。その一つは、リジン、スレオニンによってアスパラギン酸族アミノ酸の生合成経路を阻害することにより、植物細胞内のメチオニン含有量を低下させる系である。この系を確立するために、シロイヌナズナカルスにリジンとスレオニンを様々な濃度で添加し、カルス細胞内のメチオニン含有量が効果的に低下する条件の検討を行った。得られた最適条件でメチオニン量の低下を誘導し、96 時間後までの代謝攪乱の経時変化を理研グループと共同で解析した。さらに、メチオニン量の変動を誘導するもう一つの系として、メチオニン生合成酵素をコードする *CGS1* 遺伝子の過剰発現およびジーンサイレンシングをそれぞれ誘導できるような形質転換シロイヌナズナの作出を進めている。

(4) 東大グループ

既に同定していたシロイヌナズナのモリブデントランスポーター *MOT1* のアミノ酸代謝に及ぼす影響を明らかにするために、シロイヌナズナの *mot1-1* 変異株と野生型株を通常条件とモリブデン欠乏条件で栽培し、植物の根や葉をサンプリングし、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析を行った。この結果、モリブデン欠乏だけでは、野生型植物のアミノ酸代謝はそれほど大きく変動せず、転写産物の網羅解析においても変動は顕著では無かった。またモリブデントランスポーター欠損株と野生型株についてのデータを通常条件と比較すると、それほど顕著な違いは見られなかった。しかし、モリブデントランスポーターの欠損変異株をモリブデン欠乏にさらした場合には、顕著な違いが見られた。アミノ酸については、窒素欠乏状態に似た変動パターンが見られ、転写産物の解析においても全体としては窒素欠乏における反応と似た反応が見られた。一方で、硝酸還元酵素はモリブデンをその活性発現に必須とする酵素であるが、モリブデン欠乏にさらした植物においては、硝酸還元酵素遺伝子の転写産物の蓄積量が30倍程度高まっていた。硝酸還元酵素遺伝子の発現は硝酸によって誘導されることが知られているが、モリブデン欠乏にさらしたモリブデン輸送欠損変異株の硝酸濃度は対照の 1.3 倍程度にしか増加しておらず、また、この増加

はもともと硝酸を十分に含む培地で栽培された植物の硝酸濃度に対して 1.3 倍程度に増加したということであって、通常の硝酸還元酵素の発現誘導で見られる硝酸が無い条件からある条件に移した場合の誘導とは性質が異なっている、すなわちモリブデンによる誘導であると考えられる。また、モリブデンは広範な範囲に影響を及ぼしていることが示された。これらの結果を論文発表した(同 5)。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Kusano M, Fukushima A, Redestig H, Kobayashi M, Otsuki H, Onouchi H, Naito S, Hirai MY, Saito K. (2010) Comparative metabolomics charts the impact of genotype-dependent methionine accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*. Mar 31. (DOI: 10.1007/s00726-010-0562-y)
2. 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. *J. Plant Res.* 123: 291-298. (DOI 10.1007/s10265-010-0337-2)
3. Horai, H, Arita, M, Kanaya, S, Nihei, Y, Ikeda, T, Suwa, K, Ojima, Y, Tanaka, K, Tanaka, S, Aoshima, K, Oda, Y, Kakazu, Y, Kusano, M, Tohge, T, Matsuda, F, Sawada, Y, Hirai, MY, Nakanishi, H, Ikeda, K, Akimoto, N, Maoka, T, Takahashi, H, Ara, T, Sakurai, N, Suzuki, H, Shibata, D, Neumann, S, Iida, T, Tanaka, K, Funatsu, K, Matsuura, F, Soga, T, Taguchi, R, Saito, K and Nishioka, T (2010) MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass. Spectrom.* 45: 703-714. (DOI: 10.1002/jms.1777)
4. Hanada K, Sawada Y, Kuromori T, Klausnitzer R, Saito K, Toyoda T, Shinozaki K, Li WH, Hirai MY. (2011) Functional compensation of primary and secondary metabolites by duplicate genes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Biol. Evol.* 28: 377-382. (DOI: 10.1093/molbev/msq204)
5. Ide Y, Kusano M, Oikawa A, Fukushima A, Tomatsu H, Saito K, Hirai MY and

Fujiwara T. (2011) Effects of molybdenum deficiency and defects in molybdate transporter MOT1 on transcript accumulation and nitrogen/sulphur metabolisms in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 62:1483-97. (DOI:10.1093/jxb/erq345)

6. Stotz HU, Sawada Y, Shimada Y, Hirai MY, Sasaki E, Krischke M, Brown PD, Saito K, Kamiya Y. (2011) Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J.* Mar 21, 2011 (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04578.x).

(4-2) 知財出願

① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)

発明の名称:スケジューリング装置、スケジューリング方法、スケジューリングプログラム、記録媒体、および質量分析システム

発明者:澤田 有司、平井 優美

出願人:独立行政法人理化学研究所

出願日:平成 22 年 4 月 28 日

出願番号:特願 2010-104563

② CREST 研究期間累積件数(国内 2件)