

終了報告書(公開用要約)

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)	ロイド・W・サムナー(the University of Missouri, Columbia)

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

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、これらの生物学および技術的な課題に統合的なアプローチで取り組む。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。メタボロミクス研究による低炭素社会実現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、植物特異的代謝の理解をより一層深める必要がある。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行う。得られた成果を元に、応用的な植物種への展開や内外の研究コミュニティへのサービスも同時に進める。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。従ってメタボロミクスの発展は、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。対象化合物の生合成機構を遺伝子レベルで解明するファイトケミカルゲノミクスや高収量・ストレス耐性を持つ作物の育種の発展に寄与する。

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ー質量分析(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。FT-ICR-MS の優れた検出ピーク分解能を利用した、植物の含硫黄二次代謝

物を網羅的に測定する「S-オミクス」を報告した。また、同手法を窒素原子を含む代謝物に展開した。すなわち、FT-ICR-MS/MS を用いて、薬用植物ニチニチソウ等に含まれるモノテルペンインドールアルカロイドを調べた。さらにマトリックス支援レーザー脱離イオン化法-質量分析(MALDI-MS)とイメージング質量分析(IMS)を基盤としたメタボロミクス手法を開発し、含窒素代謝物の植物組織間の蓄積分布を可視化した。

同様に、オービトラップ型-質量分析計を用いて解析し、安定同位体酸素を導入したマメ科植物のメタボローム解析を米国チームと共同して行い、特定代謝経路の化合物のアノテーションを行った。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、ノック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。また、シロイヌナズナにおける代謝物プロファイリングデータベース「AtMetExpress」の開発を進めた。代謝物情報を広く研究者に利用可能な形で公開し、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。

研究成果と社会的インパクト

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。フラボノイド生合成制御転写因子(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乾燥ストレス耐性の関係を明らかにした。これらの知見を応用することにより、育種による農作物の環境ストレス耐性の改善が期待される。

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を同定した。同タイプの脂質代謝物の蓄積誘導が他の作物(イネやトマト、大豆)にも共通している事を発見し、グルクロン酸脂質がさまざまな植物で広くリン欠乏ストレスの緩和に役立っている可能性を示した。また、シロイヌナズナ葉における高温ストレス時のリポドームおよびトランスクリプトームを解明し、脂質組成変化に寄与する遺伝子の推定と機能解析を進めた。これらの知見を応用することにより、リン欠乏に耐性な植物や、高温ストレスに対する耐性を獲得した植物を作り出せる可能性がある。

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」の応用展開を始めた。47 種類の植物の凍結乾燥粉末サンプルにおける含硫黄代謝物の網羅的なスクリーニングを行った結果、アルギニンとアスパラガス酸で構成される新規含硫黄代謝物アスパラプチ

ンを発見した。メタボロームのデータから硫黄原子を含む二次代謝物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。

また、薬用植物ニチニチソウ等に含まれる含窒素代謝物をまとめて解析するメタボローム解析手法「N-オミクス」を行い、部位特異的な蓄積の存在を明らかにした。N-オミクスを用いると窒素原子を含む代謝物の高精度な探索が可能となると期待される。また、代謝物の植物内における高蓄積部位を含む情報を得ることができるため、トランスクリプトミクスとの統合メタボロミクス研究に取り入れることで、生合成に関連する遺伝子の機能同定が期待できる。

米国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脂質メタボロミクス(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。例えば、日本側で確立したリポドミクス解析は米国共同研究者による脂質生合成関連酵素遺伝子の機能解析に用いられ、日米の共著として Plant Physiology 誌へ発表した。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。日本側から複数の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。米国側からも若手研究員が数か月訪日し、リポドミクス解析の手法を用い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。従来の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 23 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」と「N-オミクス」は Analytical Chemistry 誌と Frontiers in Plant Science 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 17 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。国際会議等 18 件の招待講演にて研究成果を発表した。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

タを米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からも閲覧可能とした。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

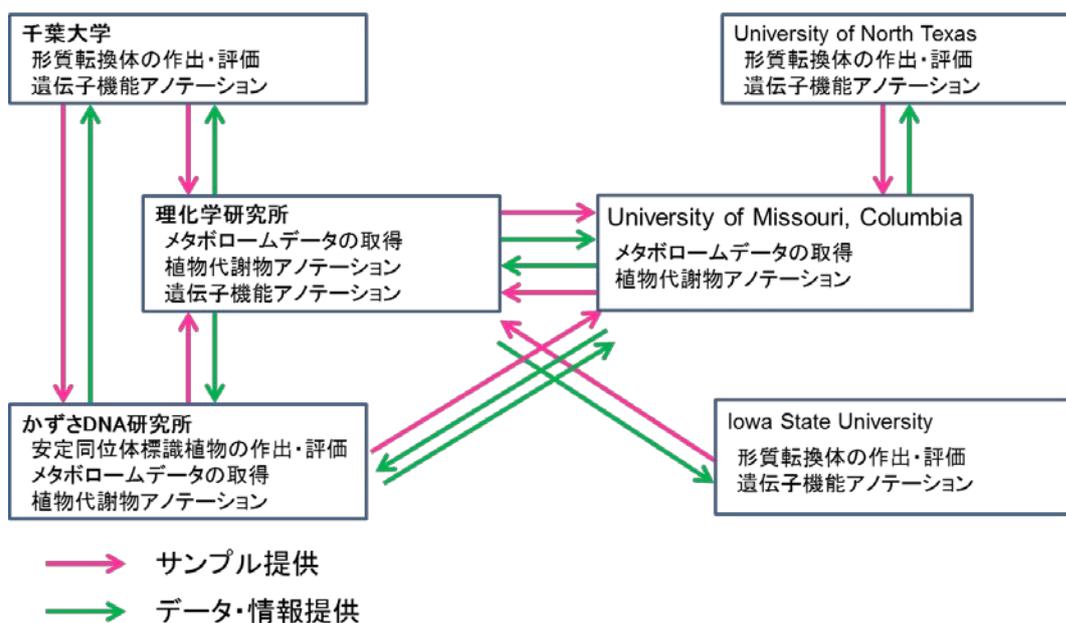


図: 日本—米国間の研究実施体制の模式図