

(平成 25 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 25 年度実施報告書

研究代表者

氏 名 齊藤 和季
所 属 (独) 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. 研究実施内容

1-1. 研究実施の概要 公開

メタボロミクスはシステム生物学の重要な一分野であるが、多くの技術的な課題が残されている。本提案の国際共同チームは焦点を絞った生物学的な研究を推進するために、これらの技術的な課題（精度の高い代謝物アノテーションの向上など）に統合的なアプローチで取り組む。本年度は以下の研究を行った。

1. シロイヌナズナを用いたフェニルプロパノイド（フラボノイド）のゲノム機能科学を進め、分子生物学的、生化学的解析により、機能未知の酵素遺伝子の機能を同定した。また、花粉特異的フラボノイドの構造を決定した（論文投稿中）。さらに、フラボノイド蓄積量の異なる植物変異体のメタボロミクスとトランスクリプトミクス、抗酸化活性を調べた結果、アントシアニンの過剰蓄積がシロイヌナズナの環境ストレス耐性獲得に寄与することを示した（本年度 *The Plant Journal* 誌に発表）。
2. 昨年度は、脂質を網羅的に解析する「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の蓄積するグルクロン酸脂質について報告した（昨年度 *Nature Communications* 誌に発表）。本年度も引き続き、栄養欠乏・環境ストレス条件下の植物体と遺伝子破壊変異体の膜脂質組成を網羅的に調べた。脂質代謝物のアノテーションを進め、ストレス応答する代謝経路の推定と、候補となる酵素遺伝子の破壊変異体パネルスクリーニングを進めた。
3. 昨年度は、FT-MS の優れた検出ピーク分解能を利用した、含硫黄二次代謝物を網羅的に測定できる分析系 S-omics について報告した（昨年度 *Analytical Chemistry* 誌に発表）。本年度も引き続き、代謝物アノテーションの一環としてメタボロームデータを取得し、データのウェブアプリケーション RIKEN HIFI (<http://spectra.psc.riken.jp/menta.cgi/hifi/index>) を開発した（論文投稿準備中）。
4. シロイヌナズナの代謝物および遺伝子アノテーションの向上のために、シロイヌナズナ変異体 50 ラインの代謝物データベース MeKO (<http://prime.psc.riken.jp/meko/>) を開発した（*Plant Physiology* 誌に受理）。また、メタボロミクス解析を用いた植物特異的代謝物のアノテーションパイプラインを整備し、イネに含まれるフラボン配糖体を含む代謝物のアノテーションを行い、データベース ReSpect に登録した（<http://spectra.psc.riken.jp/>、昨年度 *Phytochemistry* 誌に発表、本年度 *Metabolomics* 誌に発表）。
5. シロイヌナズナを宿主として用いて、外来の機能既知の酵素、機能未知の酵素と転写因子を導入した組み換え植物を作製した。複数の遺伝子を導入することにより初めて現れる効果を検出することを狙い、植物へ導入する遺伝子の組み合わせに留意した。本年度は、選抜した組み換え植物の中から、導入した遺伝子を高発現するラインを選抜し、メタボローム解析による代謝産物の解析を進めた結果、遺伝子機能と代謝物アノテーションの両面で知見を得た。
6. 複数種類の安定同位体ラベル (^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{34}S) と超高分解能 Orbitrap-MS を組み合わせて、正確な元素組成を元にした代謝物アノテーションの効率化および精密化を図る研究を進めた。本年度は、安定同位体情報を加味したタルウマゴヤシ地上部のメタボローム解析を行い、リストを作成した。また、分析データの中から安定同位体でラベルされた代謝物を効率的に見つけ出すための解析支援ソフトを完成させ、安定同位体を用いた代謝物解析を効率的に進めるためのワークフローの確

立を推進した。

7. 特定の外来遺伝子を導入した組換え体植物や遺伝子欠損変異体での生物学的考察にもとづいて、シロイヌナズナにおける組織的な代謝物アノテーションを進めた。本年度は、シロイヌナズナに導入するためのコンストラクト、特に、複数の遺伝子を一度に導入することのできる多重連結ベクターを用いたコンストラクトの作製を完了し、現在形質転換シロイヌナズナ(T2 世代)の選抜中である。

2. 研究実施体制 公開

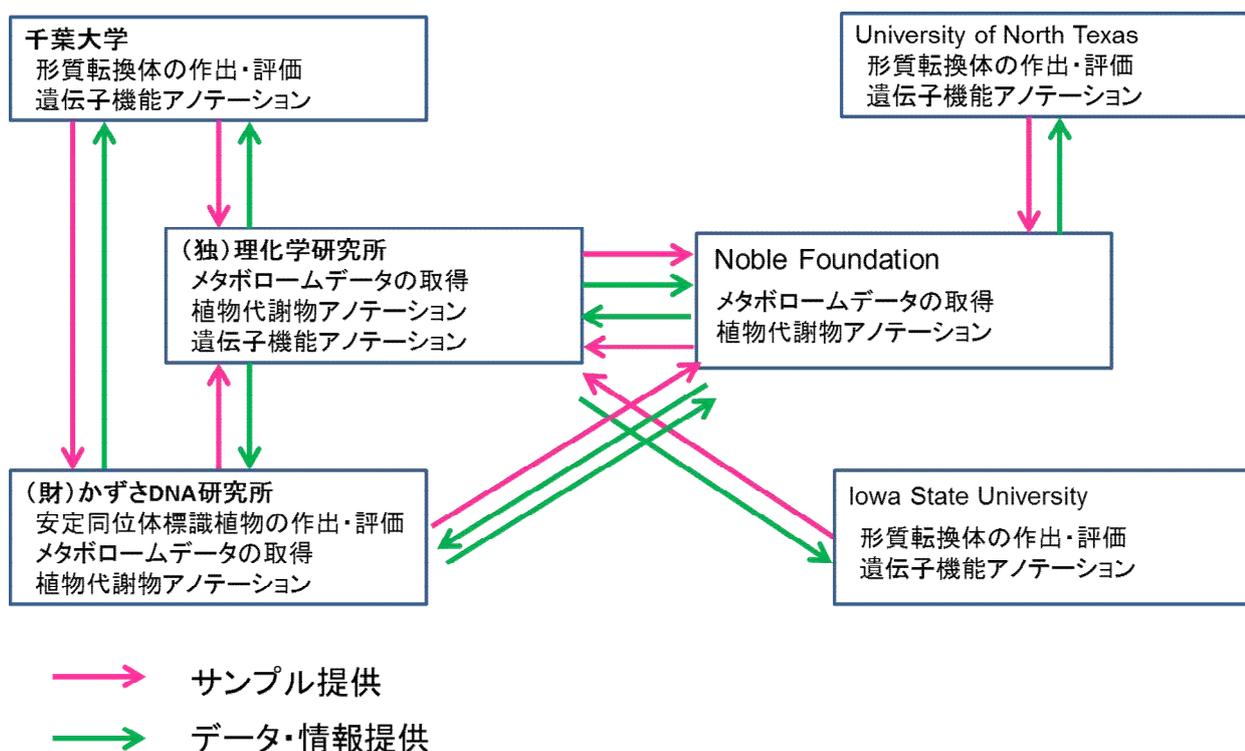
2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	斉藤 和季	(独) 理化学研究所	環境資源科学研究センター 統合メタボロミクス研究グループ	副センター長、 グループディレクター
主な共同研究者	山崎 真巳	千葉大学	大学院薬学研究院	准教授
主な共同研究者	鈴木 秀幸	(財) かずさ DNA 研究所	産業応用技術研究室	主席研究員

2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	Lloyd Sumner	Noble Foundation	Plant Biology Division	Professor
主な共同研究者	Rick Dixon	University of North Texas	Department of Biological Sciences	Professor
主な共同研究者	Basil Nikolau	Iowa State University	Department of Biological Sciences	Professor

2-3. 両国の研究実施体制



3. 原著論文発表 公開

3-1. 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 3 件	(1 件)
計 3 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. Yongzhen Pang, Xiaofei Cheng, David V. Huhman, Junying Ma, Gregory J. Peel, Keiko Yonekura-Sakakibara, Kazuki Saito, Guoan Shen, Lloyd W. Sumner, Yuhong Tang, Jianqi Wen, Jianfei Yun and Richard A. Dixon, “Medicago glucosyltransferase UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis”, *Planta*, 238, pp.139-154, 2013 (DOI: 10.1007/s00425-013-1879-z) 米国チームとの共著論文
2. Ryo Nakabayashi, Keiko Yonekura-Sakakibara, Kaoru Urano, Makoto Suzuki, Yutaka Yamada, Tomoko Nishizawa, Fumio Matsuda, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, Kazuo Shinozaki, Anthony Michael, Takayuki Tohge, Mami Yamazaki and Kazuki Saito, “Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids”, *The Plant Journal*, 77, pp.367-379, 2014 (DOI: 10.1111/tpj.12388) *メタボロミクスとトランスクリプトミクス解析により、強い抗酸化活性を持つアントシアニンの過剰蓄積は、酸化および乾燥ストレス下において ROS 蓄積を緩和し、シロイヌナズナの環境ストレス耐性獲得に寄与することがわかった。
3. 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*, 2014 (DOI: 10.1007/s11306-013-0619-5) (published online: December 2013)

② 未発行論文数

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

4. 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, (accepted) 米国チームとの共著論文

以上