

(平成 26 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

「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」

平成26 年度実施報告書

代表者氏名 有田正規
(国立遺伝学研究所教授)

1. 原著論文発表

(以下の記載要領にしたがって、平成 25 年度の論文実績について記載してください。)

1-1. 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 10 件	(1 件)
計 10 件	(1 件)

1. Nakamura Y, Afendi FM, Parvin AK, Ono N, Tanaka K, Hirai Morita A, Sato T, Sugiura T, Altaf-Ul-Amin M, Kanaya S “KNapSAcK Metabolite Activity Database for retrieving the relationships between metabolites and biological activities” *Plant Cell Physiol* 55(1), e7, 2014 (DOI: 10.1093/pcp/pct176)
2. Furuhashi T, Ogawa T, Nakai R, Nakazawa M, Okazawa A, Padermschoke A, Nishio K, Hirai MY, Arita M, Ohta D "Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography-mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia" *Metabolomics*, 11(1), 175-183, 2015 (DOI: 10.1007/s11306-014-0687-1)
3. *Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai R, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D “Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico” *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(1), 14-18, 2014 (DOI: 10.1080/09168451.2014.877826)
米国の LipidBlast ライブラリを用いてミドリムシのメタボローム解析を実施。ミドリムシの脂質が培養条件によってダイナミックに変化することを示した。
4. Tsugawa H, Kanazawa M, Ogiwara A, Arita M “MRMPROBS suite for metabolomics using large-scale MRM assays” *Bioinformatics* 30(16), 2379-2380, 2014 (DOI: 10.1093/bioinformatics/btu203)
5. Tsugawa H, Ohta E, Izumi Y, Ogiwara A, Yukihiro D, Bamba T, Fukusaki E, Arita M “MRM-DIFF: data processing strategy for differential analysis in large scale MRM-based lipidomics studies” *Front Genet*, 5, 471, 2015 (DOI: 10.3389/fgene.2014.00471)
6. Amin MA, Katsuragi T, Sato T, Ono N, Kanaya S “An Unsupervised Approach to Predict Functional Relations between Genes Based on Expression Data, *BioMed Research International*” 154594.1-8, 2014 (doi.org/10.1155/2014/154594)
7. Amin MA, Afendi FM, Kiboi SK, Kanaya S “Systems Biology in the Context of Big Data and Networks” *BioMed Research International*, 42857.1-11, 2014 (doi.org/10.1155/2014/428570)
8. Fukushima A, Kanaya S, Nishida K “Integrated network analysis and effective tools in plant systems biology” *Frontiers in Plant Sci.*, 5, 1-9, 2014 (doi:10.3389/fpls.2014.00598)
9. Kibinge N, Ikeda S, Ono N, Amin MA, Shigehiko Kanaya S “Integration of Residue Attributes for Sequence Diversity Characterization of Terpenoid Enzymes” *BioMed Res. International*, 753428.1-10, 2014
10. Ohtana Y, Abdullah AA, Amin MA, Huang M, Ono N, Sato T, Sugiura T, Horai H, Nakamura Y, Morita AH, Lange KW, Kibinge NK, Katsuragi T, Shirai T, Kanaya S “Clustering of 3D-Structure Similarity Based

Network of Secondary Metabolites Reveals Their Relationships with Biological Activities” *Mol. Inf.* 33, 790-801, 2014 (DOI: 10.1002/minf.201400123)

② 未発行論文数

(受理前のものは含めないでください。受理後、掲載巻・号・ページ等が未定の場合は”accepted”、決定しているものは”in press”と付記してください。)

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	(0 件)
国際誌 2 件	(1 件)
計 2 件	(1 件)

1. Li D, Ono N, Sato T, Sugiura T, Altaf-Ul-Amin M, Ohta D, Suzuki H, Arita M, Tanaka K, Ma Z, Kanaya S
“Targeted Integration of RNA-Seq and Metabolite Data to Elucidate Curcuminoid Biosynthesis in Four Curcuma Species” *Plant Cell Physiol*, accepted, (doi:10.1093/pcp/pcv008)
2. Tsugawa H, Cajka T, Kind T, Ma Y, Higgins B, Ikeda K, Kanazawa M, VanderGheynst J, Fiehn O, Arita M
“MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis” *Nature Methods*, in press.

A 終了報告書

研究課題	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
日本側研究代表者(所属組織)	有田正規 (国立遺伝学研究所)
アメリカ側研究代表者(所属組織)※カタカナ	オリバーフィーン (カリフォルニア大学デビス校)
前期支援期間	H23 年 12 月- H27 年 3 月
日本チームの研究費(直接経費)	90,505,000 円

日本チームの主たる共同研究者(研究担当者/組織名)	金谷重彦 (奈良先端科学技術大学院大学)
	太田大策 (大阪府立大学)

様々な微細藻類における脂質代謝の違いをインフォマティクスの力で解き明かします

プロジェクトの目的と課題

バイオ燃料生産に利用される多様な微細藻類、それらの代謝を理解するための情報・ソフトウェア資源を充実させることが本研究の目的です。

バイオ燃料生産において最も効率が良いとされる微細藻類。多種多様な生物種が利用されており、それらが生産する脂質の種類も様々です。本プロジェクトは藻類が生産する脂質をより迅速に、より網羅的に同定するのに必要な情報・ソフトウェア資源を拡充することを目標にしました。脂質を迅速に、しかも定量性をもって計測するのに使われる技術が質量分析です。質量分析計を用いて代謝物を同定するのに必要なのはスペクトルのライブラリと保持時間を記載したデータベース、そして種々の藻類において存在が推定される脂質情報にあたります。本プロジェクトでは米国側で多様な微細藻類を計測し、含まれる脂質の種類を明らかにします。日本側ではそれらを同定するのに必要なスペクトルライブラリや藻類関連の文献情報を提供します。解析に必要なソフトウェアは日米で共同開発しました。

用いた技術、手法

メタボロームデータベースとアノテーションパイプラインの構築。ミドリムシの脂質合成解析と、効率よい炭素利用のメカニズム解明。

藻類の脂質を迅速に同定するためには、質量分析計の情報を検索するスペクトルライブラリや保持時間のデータベースが必要です。今回は同定する分子種をグリセロリン脂質および中性脂質とし、それらのフラグメント情報をライブラリとして整備しました。ライブラリに登録されている分子種数は 10

万を超えます。それらの分子全てについて、保持時間を実測できるおよそ 200 分子の情報を元にして保持時間を推定し、ライブラリとして整理しました。

また藻類の生合成、特に二次代謝成分について網羅的な文献調査をおこない、94 種におよぶ藻類の遺伝子 96000 件について配列と機能の情報を整理しました。この遺伝子情報は藻類の遺伝子発現量を測定する際に威力を発揮します。

米国側では多種の藻類を俯瞰するメタボローム解析をおこないましたが、日本側はミドリムシを対象を絞り、様々な培養条件下における遺伝子発現情報とメタボローム情報をあわせた解析をおこないました。特に脂質合成の経路を推定する作業をおこないました。

研究成果と社会的インパクト

作成した藻類データベースは無償公開するため、藻類のメタボロミクスを実施する研究者や脂質の質量分析をおこなう人には役に立つ計算機資源となります。また開発したソフトウェアプログラムも無償公開するため、我々のおこなった解析を誰でも再現できるようになります。

今回のソフトウェアおよびライブラリ開発により、様々な藻類が異なる種類の脂質を蓄積することを確認できました。たとえばクラミドモナスと呼ばれるモデル藻類はホスファジチルコリンを持たずジアシルグリセルトリメチルホモセリン(DGTS)を持つことで知られますが、ナンノクロロプシスという藻類もDGTSを多く持っています。またナンノクロロプシスやミドリムシは様々な高度不飽和脂肪酸を含む中性脂質(トリグリセリド)を蓄積します。これら多様な脂肪酸の組成を制御できるようになれば、バイオディーゼル研究を強力に後押しできます。

ミドリムシのワックス合成経路については、嫌気条件だけでなく炭酸が必須であることを確認できました。つまり嫌気状態にあるミドリムシは炭素を固定しながらデンプンから脂質(ワックスエステル)を発酵生産していることとなります。この発見は将来、光合成以外の新しい炭素固定法につながるかもしれません。

アメリカチームとの相乗効果に基づく特記成果

本研究で作成したスペクトルや保持時間のライブラリは日米双方のチーム無くしては成り立ちませんでした。日本側のソフトウェア開発力と米国側の測定環境、そして何よりも研究員の行き来による密なディスカッションによって、次世代のメタボロミクスプラットフォームを作成することができました。

また本研究は日米合同ワークショップ開催や国際会議を積極的に推し進めました。とりわけ日本側の代表者が2014年に鶴岡市で企画し、米国側の代表者が2015年にサンフランシスコで開催する予定の国際メタボロミクス学会は、本研究の成果を発表する場であると同時に、日米だけでなく、世界中の研究者に日本のメタボロミクスを紹介するきっかけを作りました。

研究成果物

主要論文

- Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai R, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D “Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico” *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(1), 14–18, 2014 (DOI: 10.1080/09168451.2014.877826)
- Furuhashi T, Ogawa T, Nakai R, Nakazawa M, Okazawa A, Padermschoke A, Nishio K, Hirai MY, Arita M, Ohta D “Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography–mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia” *Metabolomics*, 11(1), 175–183, 2015 (DOI: 10.1007/s11306-014-0687-1)
- Tsugawa H, Arita M, Kanazawa M, Ogiwara A, Bamba T, Fukusaki E “MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics” *Anal Chem* 85(10):5191–5199, 2013

データベース

MassBank データベース <http://www.massbank.jp>

KNApSAcK データベース <http://kanaya.naist.jp/KNApSAcK/>



特になし

B FINAL REPORT (DIGEST FOR PUBLIC)

Project Title	Integrating cheminformatic resources for investigating photoautotrophic and mixotrophic metabolism in algae
Research Leader in Japan (Organization)	Masanori Arita (National Institute of Genetics)
Research Leader in the U.S. (Organization)	Oliver Fiehn (University of California, Davis)
(First) Period	Dec. 2011 – Mar. 2015

List of Co-researchers	Shigehiko Kanaya (Nara Institute of Science and Technology)
	Daisaku Ohta (Osaka Prefecture University)

Main Title

We elucidate variations of lipid metabolism in microalgae through informatics.

General Objects and Main Issues

The purpose of this study is to enhance information and software resources to understand the metabolism of various microalgae used in bio-fuel production.

Microalgae are the most efficient producer of biofuels. A wide variety of species have been investigated and are known to produce various composition of lipids. This project aimed to enhance information and software resources to identify algal lipids more efficiently and comprehensively. Mass spectrometry is a standard technology to identify lipid species easily and quantitatively, and what it requires for identification is spectral libraries, a database for retention time, and the information of lipid category that the algae are producing. In this project, the US side provided measurement information of various algae and revealed the lipid category. The Japan side prepared the spectral library and algal literature information for identification. Software platforms for the analysis were jointly developed.

Methods and Technologies

*Developing metabolome databases and annotation pipeline. Lipid analysis of *Euglena gracilis* and investigation of its carbon utilization.*

To identify lipids in microalgae rapidly, mass-spectral libraries and the database for retention time are necessary. Our study focused on glycerophospholipids and neutral lipids and prepared a theoretical library of their fragment information. The number of molecular species registered exceeded 100,000. For these molecules, retention times were estimated from about 200 actually measured records. We also conducted a thorough literature survey on algal biosynthesis and collected sequence and functional information of 96000 genes in 94 species. The information is useful in measuring gene expression levels in microalgae.

The US side conducted metabolome analysis of a variety of microalgae. The Japan side focused on *Euglena* and analyzed its gene expression and metabolome information under different culture conditions. In particular, its lipid biosynthesis was investigated.

Results and Social Impacts

Our algal databases are freely available and they are useful resources for researchers in metabolomics and analytical chemistry on lipids. The software programs are also free so that anyone can reproduce the analysis we conducted.

We could confirm the accumulation of various lipid species in different microalgae. For example, *Chlamydomonas reinhardtii*, the model microalgae, is known to have diacylglycerol-O-trimethyl-homoserine (DGTS) instead of phosphatidylcholine, but another alga, *Nannochloropsis oculata*, also has DGTS as a major component. The *Nannochloropsis* and *Euglena* also accumulates neutral lipids (triglycerides) with various highly unsaturated fatty acids. Artificial control of the composition of these lipids will boost the biodiesel research.

We could also confirm the requirement of carbon dioxide under the anaerobic wax-ester synthesis of *Euglena*. This means that the carbon source of wax-ester is not only starch but also single carbons. This finding may lead to a new carbon fixation method in the future.

Synergies between US and Japanese Teams

The development of libraries and databases in this project would have been impossible without either of the international team. Software development in the Japan group and the analytical platform in the US group were indispensable and the dense discussion through meetings and exchange researchers was the key to the development of our next-generation metabolomics platform.

This project also strongly promoted organization of Japan-US joint workshops and international conferences. The international metabolomics conference was coordinated by the Japan PI in Tsuruoka, 2014, and will be organized by the US PI in San Francisco 2015.

This conference series is a good venue of our research presentations and also a place to introduce research in Japan to the world.

Achievements

Major publications

- Ogawa T, Furuhashi T, Okazawa A, Nakai R, Nakazawa M, Kind T, Fiehn O, Kanaya S, Arita M, Ohta D “Exploration of polar lipid accumulation profiles in *Euglena gracilis* using LipidBlast, an MS/MS spectral library constructed in silico” *Biosci Biotechnol Biochem*, 78(1), 14–18, 2014 (DOI: 10.1080/09168451.2014.877826)
- Furuhashi T, Ogawa T, Nakai R, Nakazawa M, Okazawa A, Padermschoke A, Nishio K, Hirai MY, Arita M, Ohta D “Wax ester and lipophilic compound profiling of *Euglena gracilis* by gas chromatography–mass spectrometry: toward understanding of wax ester fermentation under hypoxia” *Metabolomics*, 11(1), 175–183, 2015 (DOI: 10.1007/s11306-014-0687-1)
- Tsugawa H, Arita M, Kanazawa M, Ogiwara A, Bamba T, Fukusaki E “MRMPROBS: a data assessment and metabolite identification tool for large-scale multiple reaction monitoring based widely targeted metabolomics” *Anal Chem* 85(10):5191–5199, 2013

Databases

MassBank <http://www.massbank.jp>

KNAPSAcK <http://kanaya.naist.jp/KNAPSAcK/>

Illustrations

none