

「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
代謝システム解析チーム・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。本年度は、ラージスケールデータに基づく仮説構築を行うための基盤として、ハイスループット高速代謝産物分析系を確立し、またデータベース構築に着手した。これにより、今後は大規模なメタボロームデータの収集が可能となり、このデータセットを利用して代謝制御機構を予測するための道が拓けた。また、先行研究としてメチオニン生合成に着目し、その制御機構を解明するための分子遺伝学的研究を進行している。

2. 研究実施内容

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)。トランスクリプトームデータが公開データベース上に数千の単位で登録され、利用可能であるのに対し、メタボロ

ームデータについては、トランスクリプトームデータベースに匹敵する公開データベースは存在しない。そこで本年度は、データベースを構築して取得したメタボロームデータ(ターゲット代謝産物データ)を公開することを目指した。現状のメタボローム解析技術およびスループットでは、トランスクリプトームデータベースのデータ登録数に匹敵する数のメタボロームデータを取得するのは非常に困難であるため、予め測定代謝産物をターゲットした代謝プロファイリングではあるが、極めてスループットの高い分析系を確立し、数千の単位のデータを取得する戦略をとった(理研担当)。トランスクリプトームデータについては、本年度は既存の公開データベースに登録されているものを主に利用し、データマイニングに必要なデータベース構築とデータ整理をおこなった(NAIST 担当)。特にトランスポーターをコードすると予測されるシロイヌナズナ遺伝子について、詳細な検討を行った。これと平行して、既知および新規のメチオニン生合成関連変異体について、代謝攪乱の起きた実験系の先行例として解析をおこなった(北大担当)。また、アミノ酸代謝との関連で研究されることの少なかったトランスポーター遺伝子について、21年度以降の研究内容を検討した(東大・NAIST 担当)。

研究結果

(1) 理研グループ

1. アミノ酸を中心とした代謝プロファイルの高速分析系を既に確立し、これまでに、約 3,000 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ている。その結果、20 種のタンパク性アミノ酸のうちいずれかまたはいくつかの蓄積量に変化しているラインが1割程度の頻度で見つかっている。このうち、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、前年度に引き続き詳細な解析を行った(未発表)。また、約 3,000 のデータをすべて利用して、原因遺伝子と代謝プロファイルとの関連を詳細に調べている(NAIST と共同)。

2. 上記の高速代謝プロファイル分析系の精度とスループットを向上させるために、UPLC™-タンデム四重極型質量分析装置(UPLC-TQMS)を昨年度導入した。本年度は、本装置を安定して稼働するよう整備と条件検討を行った。具体的には、理研のメタボローム解析プラットフォーム構築の一環として購入した約 1,000 の標準化合物ライブラリーについて、UPLC-TQMS による MS/MS 分析(multiple reaction monitoring; MRM)で安定的に定量データが取れる条件を検討し、うち約 400 化合物の条件決定に成功した。また、標準化合物、および植物からの抽出物のハンドリングをほぼ自動化することができ、「ワイドターゲットメタボロミクス(Widely targeted metabolomics)」の技術基盤を確立した。ケーススタディとして、代表的な植物14種の種子(または種皮)の代謝産物分析を行い、種(しゅ)に特異的な代謝プロファイルを見いだすことに成功し、比較メタボロミクスへの道を拓くことができた(Sawada et al. (2009) Plant Cell Physiol)。得られた種々のデータセット(標準化合物の MRM 条件、MS スペクトル、MS/MS スペクトル、植物サンプルの代謝プロファイルデータなど)をウェブサイト PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics)内の DROP Met および ReSpect から公開している。

PRIME (Platform for RIKEN Metabolomics) (Akiyama et al. (2008) In Silico Biology)

<http://prime.psc.riken.jp/>

DROP Met (Data Resources Of Plant Metabolomics)

http://prime.psc.riken.jp/?action=drop_index

ReSpect (RIKEN MSn Spectral Database for Phytochemicals)

<http://spectra.psc.riken.jp/MassBank/>

(2) NAIST グループ

1. 理研グループで取得した、約 3,000 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/>)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(未発表)。

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>)を用いて、昨年度に引き続きシロイヌナズナのトランスporter 遺伝子候補について整理し、アミノ酸代謝に関連するトランスporter 遺伝子を推定するための解析を行った(東大と共同)。

(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

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。*mto1*, *mto2* 変異体については 10 回の戻し交雑を完了し、メタボローム解析、トランスクリプトーム解析に用いる植物材料の準備を行った。

2. *mto* 変異体のアミノ酸分析

mto 変異体においてメチオニン以外のアミノ酸について代謝攪乱がみられるかを調べるために、様々な成長段階において *mto1*, 2, 3 変異体の含有アミノ酸量の分析を行った。その結果、アスパラギン酸族以外のいくつかのアミノ酸についても野生型株と比べて含有量の変動がみられ、*mto* 変異体においてメチオニン以外のアミノ酸の代謝攪乱が起きていることが示唆された。また、そのような含有アミノ酸量の変動は成長に伴って減少する傾向がみられた。

3. メチオニン生合成に影響を与える新たな変異の解析

メチオニン生合成の鍵酵素であるシスタチオニン γ -シントラーゼの mRNA 分解制御に影響を与える変異を、レポーター活性を指標にして新たに3つ同定した。これらの変異体では、内在性シスタチオニン γ -シントラーゼの mRNA 量とタンパク質量の増加がみられ、mRNA 分解制御に欠損を生じたことが示唆された。

(4) 東大グループ

本年度はほぼ旅費だけの配分であり、21年度以降の研究内容を検討することとしていた。NAISTとの共同研究などをふまえて、21年度からはアミノ酸代謝に重要な影響をおよぼすモリブデントランスポーターをはじめとしたミネラルトランスポーターの研究を中心にすすめることにした。

3. 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((独)理化学研究所、チームリーダー)

②研究項目

ハイスループット高速代謝産物分析法の確立
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

(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大学、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
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

(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、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
mto 変異体のアミノ酸分析
メチオニン生合成に影響を与える新たな変異の解析

(2)「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、准教授)

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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Akiyama, K., Chikayama, E., Yuasa, H., Shimada, Y., Tohge, T., Shinozaki, K., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Kikuchi, J. and Saito, K. (2008) PRIME: a Web site that assembles tools for metabolomics and transcriptomics. *In Silico Biol* 8: 339-345.
2. Sawada, Y., Akiyama, K., Sakata, A., Kuwahara, A., Otsuki, H., Sakurai, T., Saito, K.

and Hirai, M.Y. (2009) Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant Cell Physiol.* 50: 37-47.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)