

「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」
平成 21 年度採択研究代表者

三村 徹郎

神戸大学大学院理学研究科・教授

液胞膜エンジニアリングによる植物代謝システム制御

§ 1. 研究実施の概要

1. 研究のねらい、概要

液胞 (Vacuole) は植物、やカビに普遍的なオルガネラで、細胞体積の 80-90% を占め、空間充填、有用物質の貯蔵、細胞質の解毒・調節、代謝回転における分解機能など、様々な生理機能に深く関わっている。

本課題では、1) 植物の各器官で多彩に分化した液胞内にどのような低分子が蓄積されているかを明らかにすることで、オルガネラメタボロームのための基礎データを確立する。2) 液胞膜機能未知タンパク質を網羅的に改変する液胞膜エンジニアリングを進め、同時に、液胞と細胞質に含まれる代謝産物の網羅的解析を合わせて行うことで、境界膜としての液胞膜輸送体の変動が引き起こす代謝産物変化から、輸送機能の分子同定と解析を試みる。3) 液胞膜の輸送機能を人為的に調節することで、細胞質で働く代謝機能を形質転換することなく代謝制御する可能性を探る。ことを目指している。本研究は、液胞の機能を、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム解析を組み合わせることで明らかにし、基礎植物科学としての液胞研究を進めるとともに、人類に有用な物質を蓄積する液胞機能の改変や、それによる細胞質代謝制御方法を検討する。

2. 研究進捗状況、研究成果

三村グループでは、モデル植物であるシロイヌナズナ培養細胞、および植物体からインタクト液胞を単離し、各種クロマト-質量分析法を組み合わせることで、液胞内物質のメタボローム解析とプロテオーム解析を進め、それについて詳細を検討中である。山崎グループでは、液胞をめぐる二次代謝産物の生産と蓄積について、二次代謝関連遺伝子の過剰発現ならびに遺伝子抑制変異株のトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行って液胞機能の解明を進めている。青木グループ、杉山グループでは、三村グループから提供された液胞サンプルについて、それぞれ FT-ICR-MS を利用した解析を進めている。これまでに、既知の代謝産物の他に、液胞に含まれていると想定されていなかった化合物を見出しつつある。

また、三村グループと青木グループでは、シロイヌナズナ培養細胞、植物体について、複数の形質転換系の確立に成功した。現在、以下の三つの遺伝子1) At1g75220 (Identical to Sugar transporter)、2) At3g21690 (MATE efflux family protein)、3) At3g62700 (ABC transporter ATMRP14) に注目して検討を進めている。これらの形質転換系から液胞を単離し野生株と比較することで、機能未知遺伝子の解析を進めている。

3. 将来展望

液胞は、現在の技術を持ってすれば、高純度で、かつ多量に単離できるオルガネラの一つである。オルガネラにターゲットしたポストゲノム解析として、膜タンパク質の機能同定を進めるために、液胞内物質の網羅的同定を始めたが、個々の化合物の同定には困難が多く、まだ時間がかかりそうである。現在標準物質の存在する代謝産物を中心にその同定を進めている。膜タンパク質に加えて、液胞内タンパク質の網羅的同定も行い、液胞機能を輸送・代謝の両方の側面から解析できるようになってきた。今後は、さらに液胞機能の改変を進めることで、有用物質生産において大きな可能性を与えることを目指している。膜輸送活性を改変することで代謝を制御する可能性が見出せれば、代謝制御機構の新しい手法として、大きなインパクトを与えられる。

§ 2. 研究実施体制

(1)「三村」グループ

① 研究分担グループ長:三村 徹郎 (神戸大学大学院、教授)

② 研究項目

1. 植物細胞からの液胞単離と液胞単離技術の改良
2. 液胞膜機能未知輸送体形質転換体の作成と液胞の単離
3. 液胞内容物のメタボローム解析、プロテオーム解析

(2)「山崎」グループ

① 研究分担グループ長:山崎 真巳 (千葉大学大学院、准教授)

② 研究項目

1. 二次代謝関連タンパク過剰発現体の培養
2. 形質転換体におけるメタボローム解析
3. 形質転換体におけるトランスクリプトーム解析

(3)「杉山」グループ

① 研究分担グループ長:杉山 裕子 (兵庫県立大学、助教)

② 研究項目

1. 超高分解能質量分析装置を用いた液胞代謝産物解析

(4)「青木」グループ

- ① 研究分担グループ長:青木 考 (財団法人かずさDNA研究所、室長)
- ② 研究項目
 1. LC-FTICR-MS、LC-TOF-MS を用いた代謝物分析
 2. 形質転換体作製維持
 3. 形質転換体におけるトランスクリプトーム解析

§ 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)

2-1. 「三村徹郎」グループ(神戸大学)

① 研究目的

植物における液胞機能を明らかにするために、植物細胞からインタクト液胞を単離するとともに、そのメタボローム解析を進める。また、液胞膜輸送系タンパク質を形質転換することで、機能未知タンパク質の働きを明らかにするとともに、液胞機能の向上と改良の可能性を探る。

② 研究実施方法

1. シロイヌナズナ培養細胞、植物体葉肉細胞から単離したインタクト液胞を用いて、液胞内代謝産物、液胞膜・液胞内タンパク質の網羅的解析を行う。
2. 機能未知の液胞膜タンパク質を形質転換した植物細胞を作成し、そこからインタクト液胞を単離するとともに、液胞内代謝産物の解析を行う。
3. 液胞膜輸送体の機能に基づく、植物細胞代謝の新奇制御機構を検討する。

③ 結果

1. シロイヌナズナインタクト液胞内代謝産物の CE-MS による同定、定量の確立。

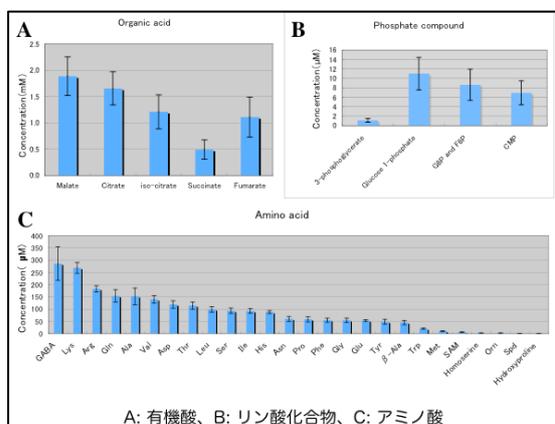


図 1 : インタクト液胞内代謝産物のターゲット分析

神戸大学での CE-MS を稼働させることによる細胞、単離液胞に含まれる既知代謝産物のターゲット分析が順調に進められるようになった。研究開始当初に協力いただいた阪大、理研と同レベルの解析が可能になっている(図 1)。

2. At1g75220 と At3g21690 を過剰発現した培養細胞から単離したインタクト液胞を、杉山グループ、青木グループに提供し、内容物のノータゲット分析を開始した。

3. これまでの研究で明らかになった液胞内に糖リン酸が存在することを検証するため、プロテオーム解析結果を参照しながら液胞内の有機リン酸化合物分解活性を測定し、液胞には有機リン酸化合物分解十分な分解活性が存在するが、それ以上のリン酸化合物が持ち込まれていることが明らかになった。液胞内に有機リン酸化合物を持ち込む可能性の一つとしてオートファジー阻害剤で処理した細胞から液胞を単離しメタボローム解析を行ったが、コントロールと大きな差はなかった。さらに、有機リン酸化合物輸送に関与する可能性のある At3g62700 を過剰発現した液胞からインタクト液胞を単離し解

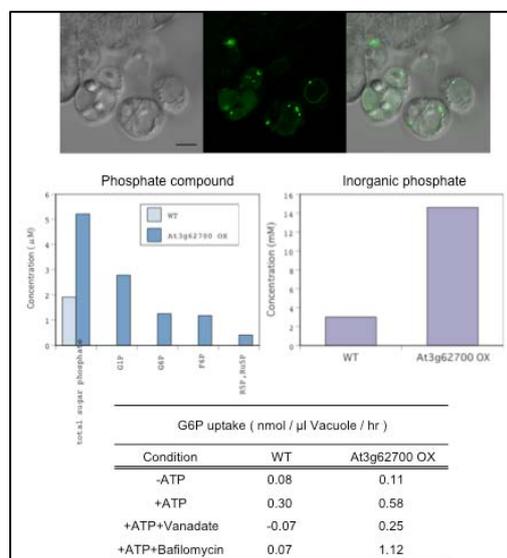


図 2 : At3g62700 の過剰発現体とそこから単離されたインタクト液胞のメタボローム解析結果、G6P 輸送活性

析を進め、過剰発現液胞では有機リン酸化合物、無機リン酸ともに増大していること、G6P の輸送活性が上昇していることが明らかになった(図2)。

4. 液胞膜エンジニアリングの手法を用いて、高塩濃度下における液胞形態の変動を明らかにすることに成功した(原著1)。

2-2. 「山崎真巳」グループ(千葉大学)

① 研究目的

植物細胞の二次代謝により生産される物質にはユニークな生理活性をもつが多い。本研究では、

液胞のメタボロームを解析することにより液胞をめぐる多様な二次代謝について、生合成・代謝経路とその発現制御メカニズムおよび細胞内物質輸送メカニズムを包括的に理解し、物質生産制御に応用可能な基礎的知見を得ることを目的とする。

② 研究実施方法

フラボノイドについては、モデル植物シロイヌナズナにおいてメタボローム分析のための基盤となりうる化合物の単離と構造決定を行った。また、アントシアニンおよびフラボノールの生産制御に

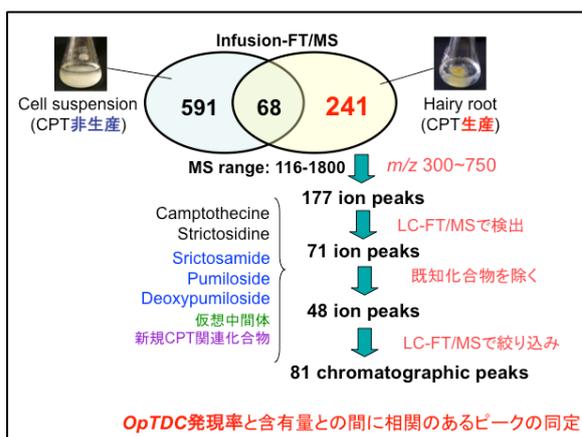


図3: アルカロイドの一種カンプトテシン生合成経路を決定するための一例。チャボイナモリトリプトファンデカルボキシラーゼ (OpTDC) 発現に伴って変動する新規二次代謝産物ピークの探索とその結果

関わる 2 つの MYB 転写因子の同時過剰発現体の遺伝子発現とメタボロームを網羅的に解析した。カンプトテシンおよびルピンアルカロイドなどのアルカロイド生産・代謝系については、代謝に関連する遺伝子を単離・収集し機能解析した。また、生合成遺伝子の発現を RNA サイレンシングにより抑制した組織のメタボローム解析により生合成経路を構成する中間体の推定を行った。

③ 結果

フラボノイドについては、シロイヌナズナにおけるメタボローム解析のための化合物情報が整い(原著 2)、今後は三村グループにより単離された液胞に蓄積されるフラボノール同定

に応用することが可能となった。また、アルカロイド生合成についてはメタボローム解析を未知の生合成経路を明らかにする手段としての可能性が示された(図3、4)。

peak No.	Detected Mass	KNASack検索結果
Peak 105	359.19676 (RT:16.62)	Formula: $C_{20}H_{28}N_2O_4$ Exact Mass: 358.18926 ex) Gelsemicine
Peak 110-1	377.20729 (RT:5.82)	Formula: $C_{22}H_{32}O_{10}$ Exact Mass: 446.12130 ex) Wogonin 5-glucoside, Echioidin
Peak 110-2	377.20734 (RT:15.13)	
Peak 138-2	447.12891 (RT:33.66)	Formula: $C_{27}H_{30}N_2O_9$ Exact Mass: 526.19513 ex) Jorumycin, Antibiotic UK 2B, Lyaloside
Peak 171-1	505.25498 (RT:18.47)	
Peak 171-2	505.25492 (RT:19.12)	
Peak 172-1	506.25823 (RT:18.29)	
Peak 172-2	506.25814 (RT:19.12)	
Peak 206	549.18478 (RT:31.2)	

図4: OpTDC 発現と正の相関を持つピークから同定された中間代謝候補化合物

2-3. 「杉山裕子」グループ(兵庫県立大学)

① 研究目的

シロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、植物体から単離したインタクト液胞内容物試料を FT-ICR-MS を用いて分析する。また、前処理法の改良を検討するため、同じ試料を種々の前処理を組み合わせさせてサンプルを作成し、質量分析の結果を比較する。

② 研究実施方法

神戸大学から供給されたシロイヌナズナ培養細胞 Deep 株、および培養細胞と植物体から単離

したインタクト液胞内容物試料を、C₁₈ 固相抽出、活性炭抽出、電気浸透法による脱塩など種々の前処理を組み合わせるサンプルを作成し、Old Dominion 大学(USA)の12T FT-ICR-MSを用いて、in fusion 分析を行った。

③ 結果

培養ブランク試料の測定の結果、ポジティブ分析で900を超える質量ピークが検出されたが、バックグラウンドの混入を除くとサンプル由来のピークは50~190となることが分かった。解析を行う

分子式の決定条件		m/z formula	theor.m/z
1. 元素数 : C>1, H>1, N<10, O>0, S<3, P<6, O>3P		216.093160	
2. DBE < C+N		231.084210	
3. C>N		250.178030	
4. 理論値との誤差 < ±1.0 ppm		258.150850	
ピーク同定結果例 (21690x で消滅したピーク[positive])		273.121340	
		319.115240	C21 H19 O1 S1 m/z = 319.115112 +0.4 ppm DBE = 13.0
			C13 H15 N6 O4 m/z = 319.114929 +1.0 ppm DBE = 10.0
			C10 H24 O9 P1 m/z = 319.115245 -0.0 ppm DBE = 0.0
		319.939040	
		369.021230	
		369.027940	C8 H13N6 O7 S3 m/z = 369.028165 -0.6 ppm DBE = 6.0
			C7 H19 N2 O9 S1 P2 m/z = 369.028100 -0.4 ppm DBE = 1.0
		377.300620	
		383.077150	C21 H19 O3 S2 m/z = 383.077012 -0.4 ppm DBE = 13.0
			C13 H15 N6 O6 S1 m/z = 383.076929 +0.8 ppm DBE = 10.0
			C10 H24 O11 S1 P1 m/z = 383.077145 +0.0 ppm DBE = 0.0
		390.276350	
		392.292230	C20 H43 N1 O4 P1 m/z = 392.292422 -0.5 ppm DBE = 1.0
		394.140340	C22 H24 N3 S2 m/z = 394.140616 -0.7 ppm DBE = 13.0
			C14 H28 N5 O2 S3 m/z = 394.139964 +1.0 ppm DBE = 4.0
			C14 H20 N9 O3 S1 m/z = 394.140433 -0.2 ppm DBE = 10.0
		400.148540	C14 H51 N3 O4 S2 P1 m/z = 400.148811 -0.7 ppm DBE = 2.0
		401.208560	C23 H25 N6 O1 m/z = 401.208436 +0.3 ppm DBE = 15.0
			C20 H34 O6 P1 m/z = 401.208752 -0.5 ppm DBE = 6.0
		401.225530	C23 H33 N2 O2 S1 m/z = 401.225725 -0.5 ppm DBE = 9.0
			C15 H29 N8 O5 m/z = 401.225542 -0.0 ppm DBE = 6.0
		409.182950	C25 H29 O3 S1 m/z = 409.183192 -0.6 ppm DBE = 12.0
			C17 H25 N6 O6 m/z = 409.183009 -0.1 ppm DBE = 9.0
		409.271020	C23 H33 N6 O1 m/z = 409.271036 -0.0 ppm DBE = 11.0
			C20 H42 O6 P1 m/z = 409.271352 -0.8 ppm DBE = 1.0
		413.137640	C20 H22 N4 O4 P1 m/z = 413.137918 +0.8 ppm DBE = 13.0
			C18 H25 N2 O7 S1 m/z = 413.137698 -0.1 ppm DBE = 9.0
			C10 H21 N8 O10 m/z = 413.137515 +0.3 ppm DBE = 5.0

図5 : FT-ICR/MS を用いたピーク同定結果

際には、今回測定したポジティブモード・ネガティブモードともに、前処理無しの分析で検出された質量ピークのほとんどに、分子式の候補を絞ることができなかった(図5)。これは、検出されたピークの多くが低い Mass Defect を有しており、C,H,O のみからの分子式推定が困難であったことが原因である。このような結果になった原因としては、試料中の有機分子が①多荷イオンを生成していた、②金属塩などとの錯体を検出していた、

③リン・酸素などを多く含む低 Mass Defect を示す化合物であった、などの可能性がある。②が最も疑わしい。したがって、低 pH(錯生成の安定度定数が小さくなり、有機物が遊離しやすい)条件に調整した試料を C₁₈ 固相抽出に供することが賢明であろうとの結論に至った。この処理により、ブランク試料で検出された多数の培養操作による混入有機物ピーク数も低減させることができるであろうと考えられる。また、同定作業についても、自動で行うことが可能なプログラムを作成することを予定している。

2-4. 「青木考」グループ(かずさDNA研究所)

① 研究目的

液胞膜タンパク質遺伝子形質転換体細胞または植物体から得られた、単離液胞および細胞質画分に見られる代謝産物を超高分解能質量分析装置(LC-FTICR/MS、GC-TOF/MS)を用いて網羅的に解析することで、導入遺伝子に起因すると推測される代謝変動を検出する。この解析をもとに、液胞-細胞質間トラフィックにおける液胞膜タンパク質の機能同定・細胞内代謝制御に関わる液胞の役割の解明に貢献する。

② 研究実施方法

(1) 液胞膜タンパク質形質転換体の作製とメタボローム解析

培養細胞 T87 系統を用いて液胞膜タンパク質遺伝子の過剰発現形質転換体を作製する。神戸大学でインタクト液胞を単離し、その後 LC-FTICR-MS、GC-TOF-MS を用い網羅的な液胞代謝物の分析を行なう。あわせて、全細胞代謝物の同様な網羅的分析を実施する。並行してシロイヌナズナ植物体の形質転換体を作製する。

(2) 形質転換体のトランスクリプトーム解析

(1)で確立された培養細胞系統を用いて、トランスクリプトームデータを取得する。取得したデータは変動遺伝子の解析や多変量解析に供するとともに、代謝関連遺伝子に着目してオミクスビューワーツールKaPPA View (<http://kpv.kazusa.or.jp/kappa-view/>)を用いたパスウェイ解析を実施する。

③ 結果

(1) 液胞膜タンパク質形質転換体の作製とメタボローム解析

標的遺伝子 At1g75220 と At3g21690 を過剰発現する T87 系統形質転換体細胞の作製を行った。標的遺伝子の発現およびGFP融合タンパク質による液胞膜局在も確認し、At3g21690 過剰発現細胞を用いた細胞全体での代謝物変動の調査を終了した。また At1g75220 過剰発現細胞の分析にも着手した。

At3g21690 過剰発現細胞でコントロールの3倍以上増加していた代謝物は Positive/Negative あわせて142 代謝物、逆に3分の1以下に減少していた代謝物は183 代謝物検出された(表1)。フラボノイド類が過剰発現細胞で増加している傾向が見られた。この中には DEEP 単離液胞に検出された代謝物も含まれ、液胞で代謝物蓄積レベルが変動している可能性を強く示唆している。

At3g21690 過剰発現植物体ロゼット葉で、「単離液胞中に検出される代謝物で、かつ At3g21690 過剰発現培養細胞で増加していた代謝物」に注目すると、3種のケンフェロール

表 1. At3g21690 過剰発現細胞でコントロールと比べて蓄積が3倍以上変化した代謝物

Fold change (ox/cont)	m/z	molecular formula	delta ppm	Database annotation	Class	Found in DEEP vacuole?
Not in cont	329.1380	C19H20O5	-1.20	2-Hydroxy-7,8-dehydrograndiflorone	Flavonoid	n
Not in cont	579.1715	C27H30O14	1.17	Kaempferol-3,7-di-O-Rha	Flavonoid	n
Not in cont	409.1627	C22H26O6	1.28	3,5-Di-O-methyl-8-prenylafzelechin-4beta-ol	Flavonoid	n
13.50	741.2251	C33H40O19	1.93	Kaempferol-3O-Rut, -7O-Rha	Flavonoid	n
12.11	595.1663	C27H30O14	0.89	Kaempferol-3O-Glc, -7O-Rha	Flavonoid	n
8.06	329.0883	C14H18O9	1.67	Pseudolaroside B	benzoic acid	Y
8.02	353.2689	C21H36O4	1.05	Montanol	Diterpenoid	n
4.37	257.1168	C16H16O3	-1.72	7-Hydroxy-5-methoxyflavan	Flavonoid	n
4.20	182.0813	C9H11N1O3	0.50	L-Tyrosine		n
4.19	380.3010	C19H41N1O6	0.90			Y
3.07	207.1097	not found				Y
0.31	286.0871	C9H18O8	1.05	3-beta-D-Galactosyl-sn-glycerol		n
0.09	270.0974	C12H15N1O6	0.64			Y
Not in ox	509.2727	C25H42O9	1.14	10,11-Dihydro-12-hydroxynorolidol 3-O-beta-D-2'-acetylglucoside		n
Not in ox	540.2446	C26H34O11	1.25	trans-Dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-9-O-beta-D-glucoside	Monolignol	n
Not in ox	1710.1033	C43H70N9O45P9	0.09			Y

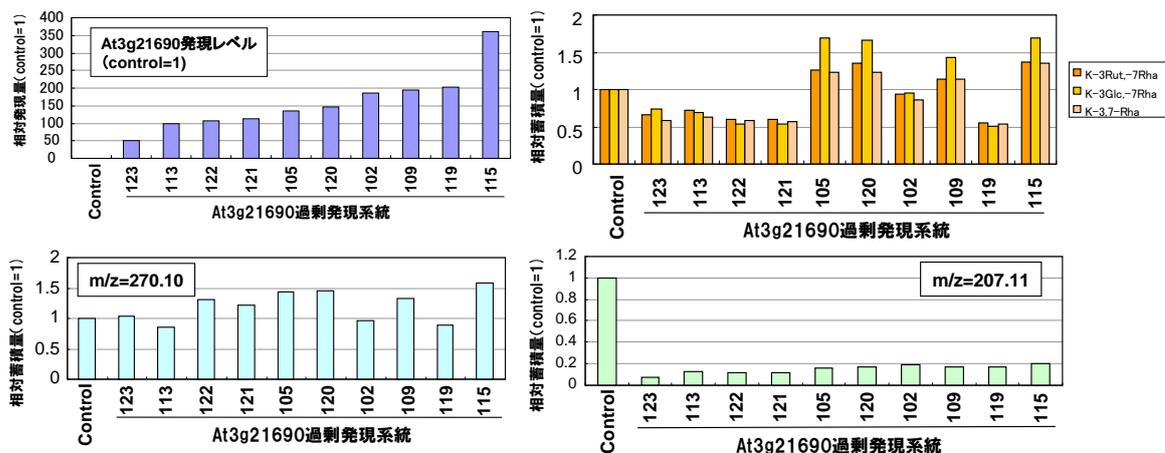


図6. At3g21690 過剰発現植物体での代謝物蓄積の変化。

(K)配糖体がいくつかのラインで増加していた(図6)。また $m/z=270.01$ が増加傾向にあった。3種のケンフェロール配糖体および $m/z=270.01$ は At3g21690 のトランスポーター機能となんらかの関係がある代謝物と推測している。また、「At3g21690 過剰発現植物体ロゼット葉では増加し、培養細胞単離液胞にはみられなかった」範疇に属する化合物として数種のグルコシノレートと思われるピークが検出された。

At1g75220 過剰発現植物体ロゼット葉でもコントロール形質転換体植物と比べて3倍以上の蓄積量変化が見られるピークが37種程度検出された。現在 GC-MS による糖・有機酸の分析も実施している。

表2 At1g75220過剰発現植物体葉でコントロールと比べて3倍以上変化したピーク

Positive Ion Detection							
T _g /WT	RT	Detect MS	Ionization	CF	DB name	delta ppm	Name
8.15	49.48	1018.5968	[Actual + H] ⁺	C53H79N9O11		-0.01	
6.00	42.41	894.3430	[Actual + H] ⁺	C44H54N3O15P1		-0.03	
5.59	44.45	677.3750	[Actual + H] ⁺	C34H52N4O10	KNAPSAcK	-0.80	Hirsutatin A:(-)-Hirsutatin A
5.09	44.45	694.4017	[Actual + H] ⁺	C37H59N1O11	KNAPSAcK	1.37	Germerine
3.75	44.50	234.0982	[Actual + H] ⁺	C10H19N1O1S2	KNAPSAcK	0.54	(R)-8-Methylsulfinylacetyl isothiocyanate
3.33	24.51	487.1926	[Actual + NH4] ⁺	C21H27N1O11	KEGG	0.68	Indol-3-ylacetyl-myo-inositol L-arabinoside
3.18	49.51504	495.1504	[Actual + NH4] ⁺	C21H27N1O11	KEGG	0.68	Indol-3-ylacetyl-myo-inositol L-arabinoside
3.01	6.92	745.1493	[Actual + H] ⁺	C22H50O13P2S5		0.02	
0.33	15.36	226.0711	[Actual + H] ⁺	C10H11N1O5	KEGG	0.29	4-Amino-4-deoxycharismate:ADC
0.26	37.05	543.2077	[Actual + H] ⁺	C25H34O13	KNAPSAcK	0.83	Lucidumside B
0.25	21.82	277.1660	[Actual + H] ⁺	C14H20N4O2	KNAPSAcK	0.34	cis-p-Coumaroylagmatine
0.18	42.33	942.4893	[Actual + H] ⁺	C48H71N5O12S1		0.08	
0.18	38.58	617.2699	[Actual + H] ⁺	C33H46N4O9	KNAPSAcK	0.77	RP 66453
0.18	20.68	205.0973	[Actual + H] ⁺	C11H12N2O2	KEGG	0.47	L-Tryptophan
0.17	21.57	318.1195	[Actual + H] ⁺	C13H19N1O8		0.38	
0.16	36.06	603.2577	[Actual + H] ⁺	C34H42N4O2S2		-0.37	
0.16	24.36	277.1660	[Actual + H] ⁺	C14H20N4O2	KNAPSAcK	0.43	cis-p-Coumaroylagmatine
0.15	18.24	297.1545	[Actual + H] ⁺	C12H24O8		0.48	
0.15	47.31	689.3906	[Actual - OH] ⁺	C38H50O12	KNAPSAcK	1.78	Hyaldendroside A
0.12	16.12	166.0863	[Actual + H] ⁺	C9H11N1O2	KEGG	0.30	L-Phenylalanine
0.10	41.05	1318.6401	[Actual + H] ⁺	C61H111O1N1O19P3S2		-0.01	
0.06	35.33	474.2337	[Actual + NH4] ⁺	C22H32O10	KNAPSAcK	0.72	Glochidsuminoside C
Negative Ion Detection							
T _g /WT	RT	Detect MS	Ionization	CF	DB name	delta ppm	Name
20.10	6.84	436.0300	[Actual - H] ⁻	C21H15N3O2S3		-0.05	
17.33	6.83	873.0901	[Actual - H] ⁻	C25H33N3O21P3		0.03	
10.49	6.82	628.0683	[Actual - H] ⁻	C23H21N5O7P2S1		-0.07	
9.91	6.84	436.0412	[Actual - H] ⁻	C12H23N1O10S3	KEGG	-0.17	4-Methylsulfinylbutyl glucosinolate
9.38	20.95	447.0540	[Actual - H] ⁻	C16H29N2O9S2	KEGG	0.20	Glucobrassicin:Indolylmethyl glucosinolate
8.45	44.89	531.2831	[Actual - H] ⁻	C25H45N2O8P1		0.26	
8.43	9.44	436.0413	[Actual - H] ⁻	C12H23N1O10S3	KEGG	0.66	4-Methylsulfinylbutyl glucosinolate
7.81	44.45	721.3658	[Actual + HCOO] ⁻	C24H46N4O11P3		0.01	
3.99	6.69	422.0257	[Actual - H] ⁻	C11H21N1O10S3	KNAPSAcK	0.68	3-Methylsulfinylpropyl glucosinolate
0.22	18.69	315.0722	[Actual - H] ⁻	C13H16O9	KNAPSAcK	0.66	Protocatechuic acid 4-O-beta-glucoside
0.15	21.00	285.0567	[Actual - H] ⁻	C9H19O6P1S1		-0.26	
0.14	24.57	477.0551	[Actual - H] ⁻	C11H24N6O7P2S2		-0.15	
0.11	20.99	285.0566	[Actual - H] ⁻	C8H18N2O5S2		0.57	
0.09	25.31	307.0656	[Actual - H] ⁻	C12H20O7S1		0.48	
0.04	22.49	571.1305	[Actual - H] ⁻	C23H28N10S4		-0.02	

(2) 形質転換体のトランスクリプトーム解析

At3g212690 (MATE efflux family) および At1g75220 (Putative sugar transporter) 過剰発現細胞とコントロール細胞での遺伝子発現のマイクロアレイ解析を実施した。意外にも多くの代謝関連遺伝子の発現状態が変動していた(図7)。両遺伝子の導入で発現の変化している代謝遺伝子の分布は似ているため、変動をもたらしたのは導入遺伝子以外の要因かも知れず、解析を続行している。しかしながら代謝遺伝子以外に目を転じると、At3g212690 過剰発現細胞では多くの転写因子

遺伝子の変動を示すという特徴が見られた。これは At1g75220 過剰発現細胞の場合と異なる。発現の増加した転写因子と相関の高い遺伝子群の機能分布を調査中である。

図7. At3g21690

(左)および At1g75220 (右) 過剰発現細胞における変動の大きかった代謝関連遺伝子の分布。赤:発現レベルが増加した代謝経路、緑:発現レベルが減少した代謝経路。



§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M-H, Terao-Morita M., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T. (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in Arabidopsis. *Plant & Cell Physiology* 50 (12) : 2023-2033.
doi:10.1093/pcp/pcp143
2. Nakabayashi R., Kusano M., Kobayashi M., Tohge T., Yonekura-Sakakibara K., Kogure N., Yamazaki M., Kitajima M., Saito K. and Takayama H. (2009) □Metabolomics-oriented isolation and structure elucidation of 37 compounds including two new anthocyanins from Arabidopsis thaliana. *Phytochemistry*, 70, 1017-1029
doi:10.1016/j.phytochem.2009.03.021