

2007年12月10日

独立行政法人 理化学研究所

メタボローム解析によって植物代謝ネットワークを解明

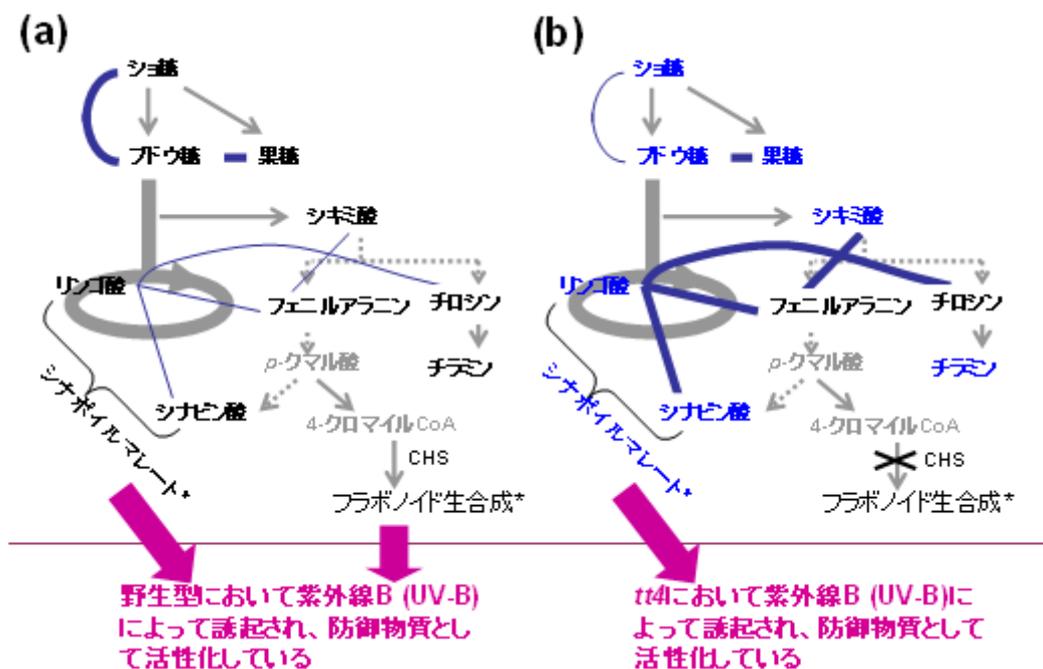
- 植物代謝システム生物学の基盤となるデータの提供と解析 -

イネや小麦、トモロコシなどの収量を上げ、食糧問題を解決するあくなき挑戦は、人口増加や耕地面積の疲弊でますます強まっています。「塩害に強い」、「病害虫に強い」、「寒さに強い」などと悪環境でも育つ品種の改良は、さまざまな作物に求められるようになっていきます。

さらに、エネルギー問題を解決する植物、健康を増進する作物などと植物を改良し、人類が直面する難問の解決を求める要望にも応えることが必須です。

植物に、がんをはじめとする医薬品を効率よく生産させる能力を持たせるなどと、研究も活発化していますが、このようなさまざまな要望にこたえるためには、植物の代謝メカニズムとともに代謝産物経路を知ることが不可欠となります。

理研植物科学研究センターのメタボローム基盤研究グループは、植物に20万種類もあると推定される多彩な代謝産物をガスクロマトグラフィー飛行時間型/質量分析計を駆使し、網羅的に解析するメタボローム解析パイプラインを確立しました。開発したシステムを活用すると、遺伝的な変異が代謝産物のネットワークの構築やトポロジーに大きな変化をもたらすことがわかりました。また、代謝物間の共起性が遺伝的変異によって特異的に制御されていることが、はじめて明らかになりました。植物代謝システム生物学の創造とともに、人類が求める植物に対する要望も満たされることとなります。



(図) 野生型 (a) と *tt4* (b) との代謝産物間相関の比較

2007年12月10日
独立行政法人 理化学研究所

メタボローム解析によって植物代謝ネットワークを解明

- 植物代謝システム生物学の基盤となるデータの提供と解析 -

◇ポイント◇

- ・高性能質量分析計を用いたメタボローム解析パイプラインを確立
- ・変異体での代謝物間の共起性から隠された代謝システムの解明と遺伝子機能の推定
- ・システム生物学による有用物質生産や作物収量などへの応用

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、植物に20万種類も存在すると推定される多様な代謝産物を網羅的に解析するために、ガスクロマトグラフィー飛行時間型/質量分析計（GC-TOF/MS）^{*1}によるメタボローム^{*2}解析パイプラインを確立し、その複雑な代謝相関ネットワークの一端を明らかにしました。これは理研植物科学研究センター（篠崎一雄センター長）メタボローム基盤研究グループの斉藤和季グループディレクター、メタボローム解析研究チームの草野都研究員、メタボローム情報ユニットの福島敦史リサーチアソシエイトらの研究成果です。

生物の遺伝型と表現型^{*3}とを結び、生物システム全体の理解を可能にする技術がメタボロミクスです。これは遺伝情報の最終産物である代謝産物を網羅的に研究する手法で、ゲノムからメタボロームまでを一つ一つ解析することで、これらのメカニズムをもとに成り立っている生物を総合システムとして理解する「システム生物学」の基盤となります。

研究では、モデル植物のシロイヌナズナを用いて、生物の生存に必須な一次代謝産物（アミノ酸や有機酸など）と、必ずしも必須ではない二次代謝産物（活性酸素の除去や抗がん作用などの健康増進機能を持つフラボノイド^{*4}など）の蓄積に異常のある変異体について、GC-TOF/MSを用いたメタボローム解析を行いました。特に、生育条件を厳密に制御して育成した、多くの植物個体のメタボロームを個体別に測定することで、個体間の微小な「ゆらぎ^{*5}」についての詳細なデータを得ながら、個体内のシステムとして保持されている代謝産物ネットワークを解明しました。その結果、異なった遺伝的変異が代謝産物ネットワークのトポロジー^{*6}に大きな変化をもたらすことがわかりました。さらに、変異体の個体内での代謝物間の共起性に注目することにより、単なる代謝物蓄積量の変化だけではわからなかった代謝システムの存在が明らかになりました。同時に、これらの代謝産物ネットワークをもとに、遺伝子発現ネットワークと統合解析することにより、植物をシステムとして捉えることを可能にしました。これは、個別の代謝産物の存在量だけに注目していた従来の研究を越えて、多くの代謝物および遺伝子ネットワークに着目した解析によって、植物の複雑な代謝システムを解明するためのシステム生物学の新たなスタートともなります。

本研究成果は、英国の電子科学雑誌『*BMC Systems Biology*』に暫定版がすでに掲載され、12月中旬には完全版が掲載されます。また、横浜で開催されます日本分子生物学会、日本生化学会の合同年会のシンポジウムで、12月12日に発表されます。

1. 背景

近年、簡便な前処理で得た細胞抽出物を、単一の分析機器を用いて一斉分析する「メタボローム解析」が、様々な生物に適用されています。この解析は、細胞や組織、器官の生化学的・生理学的状態に関する情報を引き出し、未知遺伝子の機能予測にも利用されています。植物メタボロームデータの重要な性質の一つは、代謝産物同士の存在量の間に関係性（相関）が認められることです（図1）。代謝産物は、生体内での化学反応（＝代謝）により合成・分解されます。これらの反応の総体が「代謝ネットワーク」であり、各々の代謝産物量は、代謝ネットワークを通して最終的に決定されます。従って、DNAから直接作られる転写物やタンパク質に比べ、代謝産物同士が、より強い依存関係を示すことは、直観的に理解できます。これまでの研究では、このような代謝産物間相関の生物学的意義についてはほとんど触れられておらず、代謝物の蓄積量だけに焦点を当てた解析が行われてきました。そのため、複数の代謝産物間の合成・分解や、代謝産物そのものが引き金となって進む、代謝サイクルによって起こる植物の活動や、遺伝子発現を伴う植物全体の営みを理解するためには、従来の手法では不十分とされていました。

2. 研究手法

研究グループは、モデル植物のシロイヌナズナを用いたメタボローム解析および代謝産物間相関解析を行い、代謝産物の蓄積量の変化（存在量自体の増減）と代謝産物の相関関係（存在量制御関係の親密さ）の双方から、代謝産物が引き金となっている植物の営みの検証を試みました。相関パターンの違いとその意味に関して理解を深めるために、ある代謝物の変化とその原因遺伝子との関係についてよく研究されている2種類の変異株、具体的には、一次代謝（生存に必須）の中でメチオニン^{*7}を過剰蓄積する *mto1*、および二次代謝（生存には必ずしも必須ではない）の中でフラボノイド類を全く作れない *tt4* に着目しました（表1）。さらに、比較対象として野生型 (Col-0) を加え、合わせて3種類のシロイヌナズナの地上部に対して、GC-TOF/MSによるメタボローム解析を行いました。個体にわたる相関解析には多くの個体群を必要とするため、各遺伝型のサンプリング数を、Col-0 が17個体、*mto1* が13個体、*tt4* が20個体としました。本研究では、これらサンプル種の代謝産物プロファイルデータに対する相関解析に焦点を当て、植物個体が持つ代謝産物存在量のゆらぎの意味をシステム生物学的観点からアプローチする方法で、植物メタボロミクス研究を行いました。

3. 研究成果

メタボローム解析の結果、シロイヌナズナの地上部から171個の代謝産物ピーク（既知の代謝産物が93個、MST^{*8}を含む未同定ピークが78個）を観測しました。この中で、既知の代謝産物存在量比（変異型/野生型）を調べた結果、*mto1* ではメチオニンの過剰蓄積やアスパラギン酸^{*9}生合成経路に属する代謝産物の変化を観測し、これらの結果は過去の報告（表1）とよく一致していました。このことから、確立したメタボローム解析パイプラインの妥当性を評価しました。*tt4* では、解糖系^{*10}とフェニルプロパノイド^{*11}関連代謝産物に20%程度の蓄積量の低下が見られたのみで、アミノ酸を含む多くの一次代謝産物群に顕著な変化は見られませんでした。

た。

次に、得られたデータ行列を用いて、代謝産物間相関解析を行いました。野生型と *tt4* は互いに似た相関パターンを示しますが、*mto1* ではこれらのパターンが消失していました (図 2)。これは、*mto1* の代謝システムにおいて、過剰蓄積したメチオニン生合成経路周辺だけでなく、アスパラギン酸代謝経路やポリアミン^{*12}代謝経路を含む他の代謝物相関にまで影響が及んだ結果であると考えられます。

背後にある代謝ネットワークシステムの骨格を成す関係に着目するため、これらシロイヌナズナの遺伝型 3 種類 (Col-0、*mto1*、*tt4*) に共通して観測される相関関係の抽出を行いました。その結果、ショ糖分解系の果糖ブドウ糖、ステロール^{*13}代謝系のコレステロール-シトステロール、クエン酸回路^{*14}内のコハク酸-フマル酸などの正の相関関係を観測しました。これらの代謝産物ペアは、他研究機関の研究例でも有意な正の相関を示しており、中心代謝に関わる代謝産物間には、植物内で保存性の高い相関が存在することが示唆されます。

加えて、遺伝型特異的な相関の一例として、野生型と *tt4* とを比較した結果、*tt4* ではフェニルプロパノイド経路より生合成されるシナピン酸^{*15}とクエン酸回路内のリンゴ酸について、各存在量は変化しないにも関わらず、両代謝産物間の相関が 0.89 と非常に強まっていることを見出しました (図 3)。両代謝産物は、紫外線に対して防御機能を持つシナポイルマレート^{*15}を合成する材料です。*tt4* は、抗酸化物質であるフラボノイドやアントシアニンを生合成できず、これらを使った紫外線に対する防御機構を失っているため、この観測した相関の増強は、代替代謝産物 (シナピン酸エステル類および芳香族^{*16}代謝産物) による紫外線対策の代替システムが存在することを示唆しており、代謝産物間相関解析の有用性を強く支持しました。

4. 今後の期待

今回共通して観測した代謝産物間相関は、各々の代謝産物の生合成/分解に関わる酵素タンパク質をコードしている遺伝子同士の発現相関に由来する場合もある、と予想できました。研究グループは、この仮定をもとに、代謝産物間相関から遺伝子共発現^{*17}に解析を拡張する試みも行っています。このような新たなアプローチから、新しい遺伝子制御システムの発見が期待できます。さらに、このような植物代謝産物の制御システムの理解は、代謝経路の改変技術を用いた有用物質生産、作物収量増加など、有益な応用技術に結びつきます。

厳密に制御された生育環境での植物個体に関する代謝産物データは、システム生物学にとって重要な基礎データとなります。今回開発したメタボローム解析パイプラインを用いて、基礎データを大規模に収集していくことで、植物の持つ代謝産物ネットワークの統合的理解が、さらに促進されることが考えられます。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

植物科学研究センター メタボローム基盤研究グループ

グループディレクター 斉藤 和季 (さいとう かずき)

Tel : 045-503-9488 / Fax : 045-503-9489

メタボローム解析研究チーム

研究員 草野 都 (くさの みやこ)

Tel : 045-503-9442 / Fax : 045-503-9489

メタボローム情報ユニット

リサーチアソシエイト 福島 敦史 (ふくしま あつし)

Tel : 045-503-9491 / Fax : 045-503-9489

横浜研究推進部 企画課

Tel : 045-503-9117 / Fax : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ガスクロマトグラフィー—飛行時間型/質量分析計 (GC—TOF/MS)

揮発性物質の分離・分析法であるガスクロマトグラフィー (GC; gas chromatography) に、検出器として飛行時間型質量分析計 (TOF/MS) を組み合わせた装置。GCにより分離された成分は、イオン化部 (本装置では電子イオン化法=EI; electron ionization を採用) でイオン化される。TOF/MSでは、このイオンを真空中で運動させ、電磁気力を用いてイオンを質量電荷比 (m/z) に応じて検出する。低コストで、短時間に高感度かつ大量の代謝産物データを、再現性よく測定することが可能である。

※2 メタボローム

細胞内に含まれる低分子代謝産物の総体を指す用語。代謝産物を包括的かつ網羅的に解析することにより、生体内での化学反応を全体的に把握可能にする技術を含め、ゲノム情報から転写産物 mRNA 情報 (トランスクリプトーム)、タンパク質情報 (プロテオーム) に続く代謝産物総体 (メタボローム) についてのポストゲノム科学分野が、メタボロミクスと呼ばれる。

※3 遺伝型と表現型

表現型とは、生物に実際に現れた性質をいう。表現型は、ある生物個体の持つ遺伝子の違い (遺伝型、または遺伝子型と呼ぶ) と環境条件双方の影響を受ける。表現型の例としては、エンドウマメの種子のしわの有無や、人間で言えば髪が金髪あるいは黒髪である、などが挙げられる。最近では、目に見えない細胞内の生化学的性質の違い、たとえば糖代謝異常である糖尿病などを“代謝に関わる表現型”とするように用いることも少なくない。

※4 フラボノイド

フラボノイドは、活性酸素の除去、抗がん作用、高血圧の改善、抗アレルギー作用などの健康増進機能を持つポリフェノールの一種である。花や果実の色素成分であるアントシアニン、大豆に含まれるイソフラボン、そばのルチン（フラボノール）などが一般的によく知られている。

※5 ゆらぎ

ここでは、「実験過程で発生する誤差が存在しない」と仮定した場合においても、生物内の化学反応が確率的に起こることから生じる代謝産物の存在量の変動や、外的および内的環境の変化により生じる変動を指す。狭義には、統計学の分散（あるいは標準偏差に相当）を意味することがある。

※6 トポロジー

ここでは、点と線で見立てたネットワークの幾何学的形状のことを指す。元々は数学における位相幾何学と呼ばれる比較的新しい幾何学分野の学問を指す。ネットワークグラフにおいては、点と点のつながりが重要であることからトポロジーという語が頻出する。

※7 メチオニン

必須アミノ酸の一つで、疎水性であり、側鎖に硫黄を含む。DNA 転写産物からタンパク質へと翻訳を「開始」させるメッセージを持つアミノ酸として重要な役割を担っている。メチオニンの類似物であるエチオニン耐性を持つシロイヌナズナの変異株を分離することによって得られたのが、遊離メチオニンを過剰に蓄積している *mtol* (表 1) である。

※8 MST

mass spectral tag の略。MST は主に GC/MS 分析において、電子イオン化法によりフラグメント化されたマススペクトルを指し、十分な量の強度を持つフラグメント組成と相対保持指標 (RI; retention index) により再現性よく検出される代謝産物（および誘導体）のマススペクトルと定義する。未知代謝産物に対して固有のタグを割り当てることにより、他研究機関で観測された未知代謝産物についての情報共有が可能となり、ドイツのマックスプランク研究所（ペーター・グルース = Peter Gruss 所長）が作成した GMD (Golm Metabolome Database, <http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html>) を中心としてデータの蓄積が進められている。

※9 アスパラギン酸

タンパク質を構成するアミノ酸の一つで、非必須の酸性極性側鎖アミノ酸。クエン酸回路内のオキサロ酢酸のアミノ基転移反応で生合成される。

※10 解糖系

ブドウ糖をピルビン酸に分解（異化）する生化学反応経路の名称である。ほとんど

の生物が解糖系の代謝過程を利用し、エネルギーを獲得している。ちなみに、ショ糖（砂糖）は果糖とブドウ糖が結合したもので、ヒトの脳はブドウ糖のみをエネルギー源としている。

※11 フェニルプロパノイド

自然界に存在する、芳香環に C3 基の結合した C6-C3 骨格を有するものの総称。アミノ酸のフェニルアラニンまたはチロシンを起源として、シキミ酸経路によって生合成される。主な例として高等植物の木化に重要な物質リグニンなどがある。

※12 ポリアミン

細胞分裂や増殖の制御に必要な物質と考えられ、アミノ酸のアルギニンやオルニチンから生合成される。

※13 ステロール、コレステロール、シトステロール

動植物に含まれる脂質であり、真核生物の細胞膜の一部を形成したり、その機能を調節したりする。動物由来のものではコレステロールが有名。植物特有のもので、シトステロール、スチグマステロールなどがある。

※14 クエン酸回路

ブドウ糖から作られたピルビン酸を元にして、エネルギーを産生する回路。TCA 回路またはクレブス回路とも呼ばれる。クエン酸回路を構成する化合物群としてはクエン酸、オキサロコハク酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸、オキサロ酢酸などがある。

※15 シナピン酸、シナポイルマレート

フェノールヒドロキシケイ皮酸類。シナピン酸は、抗酸化作用をもつアントシアニン生合成の材料の一種である。また、シナピン酸がリンゴ酸やブドウ糖などと反応して生合成されるのが、シナピン酸エステル類である。

※16 芳香族

ベンゼン環を含む化合物の一群。代表的な芳香族化合物は、トルエン、クレゾール、サリチル酸、ナフタレンなどが挙げられる。

※17 遺伝子共発現

複数の遺伝子の発現パターンが類似しており、多くの実験条件にわたって発現が共起すること。類似度を相関係数（+1 から -1 までの数値で表される）で測ることが多く、機能が未同定の遺伝子の機能予測に用いられる。同一の生合成経路に属する遺伝子群は概ね協調的に発現する傾向にあることから、相関係数が高い遺伝子群は、同一あるいは近接する代謝経路、もしくは同時期に起こっている反応に関連する可能性が高いと考えられる。

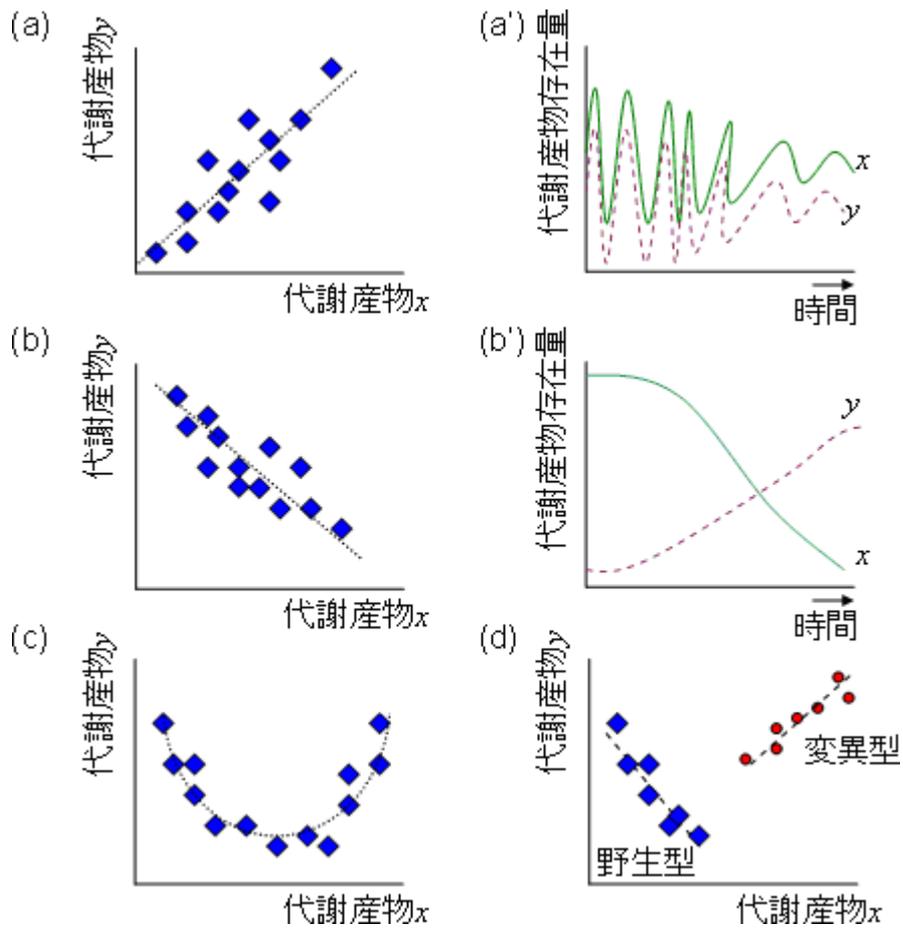


図1 代謝産物間相関の例

(a) 正の相関、(b) 負の相関、(c) 非線形相関、(d) 遺伝型間で相関関係が反転する例、(a') 代謝産物 x と代謝産物 y が正の相関関係にある時系列パターン、(b') x と y が負の相関関係にある時系列パターン。散布図のプロット点はいずれも植物個体由来サンプルを表す。

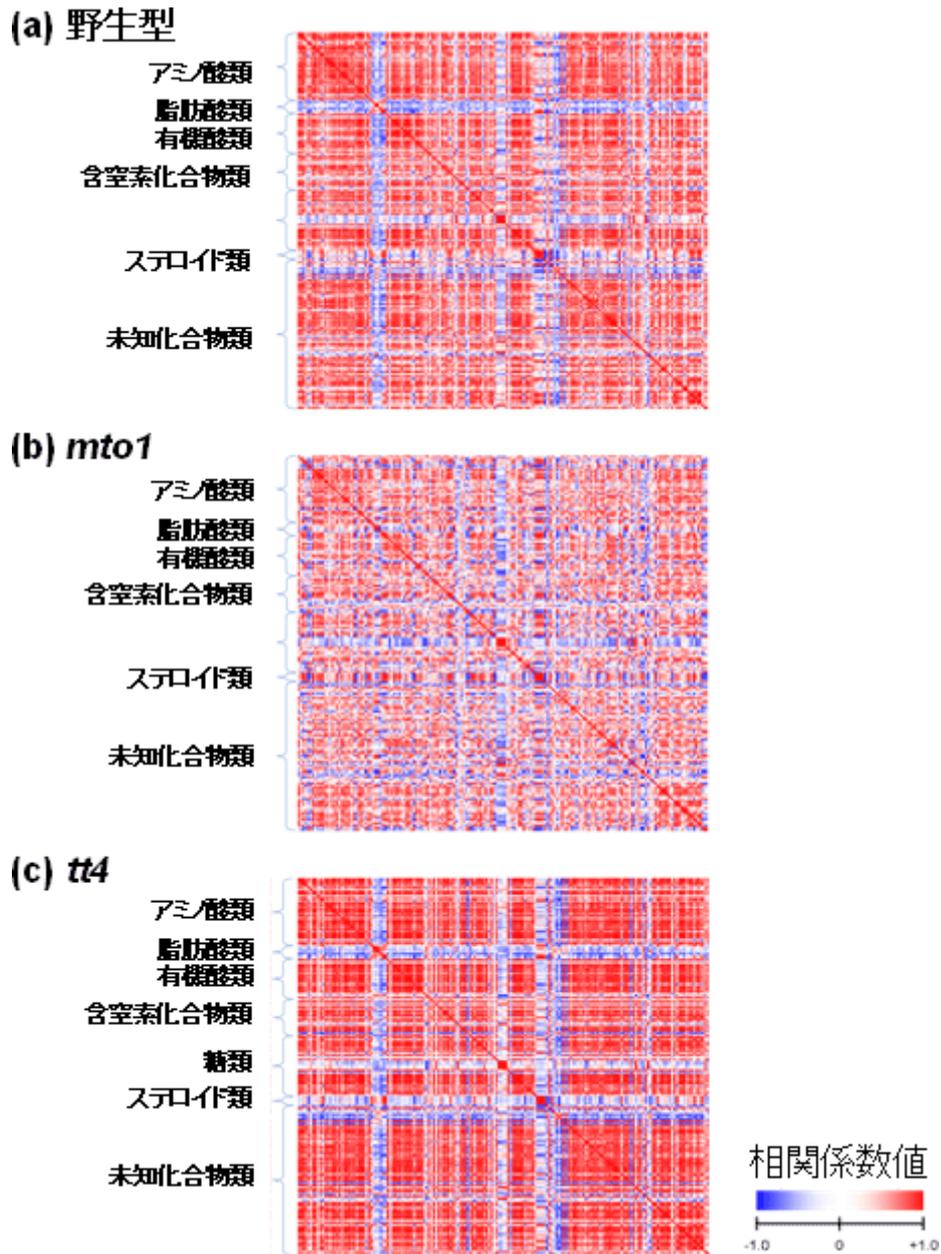


図2 遺伝型3種の代謝産物間相関行列のヒートマップ

野生型 (a) と比べ、*mto1* (b) では劇的に相関パターンが変化している。赤色は代謝産物間相関係数値が正の値を持つ代謝産物ペアを示し、青色は負の相関係数値を持つペアを表す。アミノ酸同士は圧倒的に赤色（正の相関）が多いクラスターを構成しており、脂肪酸およびステロイドについては、他の代謝産物とは負の相関を示している。色の濃淡はピアソン相関係数の大きさに対応し、赤が濃いほど正の相関関係を、青が濃いほど負の相関関係を表す。

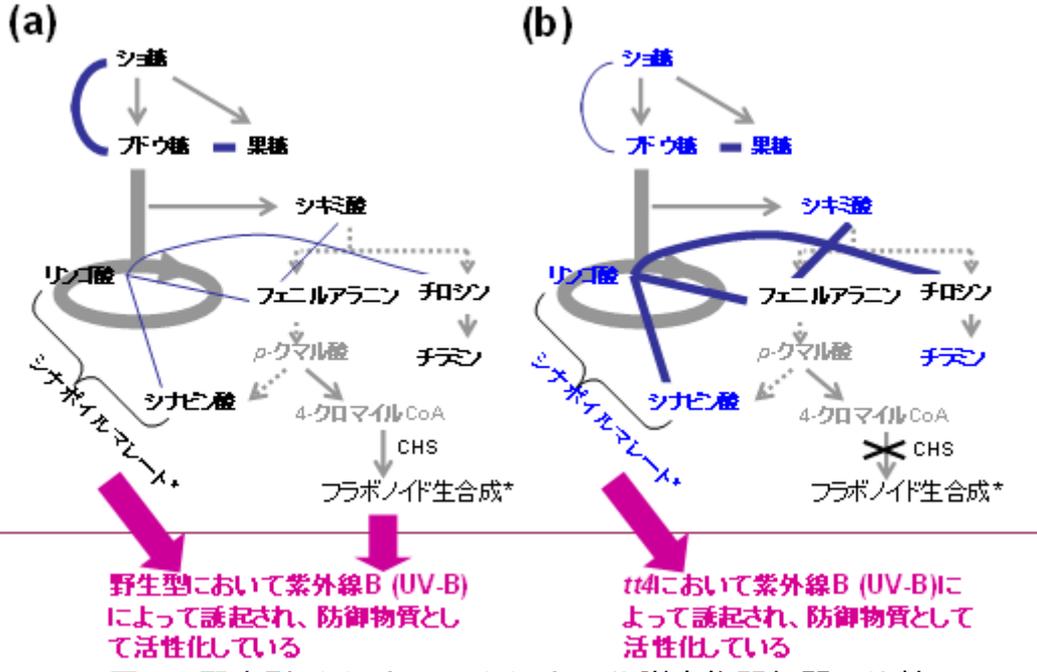


図3 野生型 (a) と *tt4* (b) との代謝産物間相関の比較

青線が代謝産物間相関を示し、相関が強いものを太く表現している。*tt4* (b) では、シナピン酸とリンゴ酸は、各存在量に変化しないにも関わらず、両代謝産物間の相関が非常に強まっていた。これは、フラボノイド類を使用した紫外線に対する防御機構を失っている *tt4* に、代替代謝産物（シナピン酸エステル類および芳香族代謝産物）による紫外線対策のバックアップ機構が存在することを示唆する。CHS はカルコンシンターゼ (chalcone synthase) の略。カルコンはフラボノイド化合物の中間体であり、CHS はこれを合成するための重要な酵素の一つ。

表 1. メタボローム解析を行ったシロイヌナズナの遺伝型 3 種類

	コロンビア-0 株 [Col-0]	遊離のメチオニンを過剰に蓄積する変異株 (<i>mtol</i> ; <i>methionine over-accumulation 1</i>)	フラボノイド色素欠損、透明な種皮を持つ変異株 (<i>tt4</i> ; <i>transparent testa 4</i>)
遺伝型	野生型	変異型	変異型
表現型	-	遊離メチオニン過剰蓄積	フラボノイド色素欠損
変異の原因	-	シスタチオニン γ -シンターゼの mRNA の蓄積を抑制するメカニズムの欠損	カルコンシンターゼ活性の欠損
関連する代謝経路	-	(一次代謝) アミノ酸合成、アスパラギン酸ファミリー	(二次代謝) フラボノイド・アントシアニン合成
過去の代謝産物分析の結果	-	シスタチオニン 2 倍、メチオニン 10~40 倍、S-メチルメチオニン 25 倍の蓄積 (以上、野生型比)	シアニジン、ケンフェロール、ケルセチンが検出されない