

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19760551
 研究課題名（和文） 有用二次代謝物質生産に資する抗酸化反応に注目した植物ストレス応答反応のメタボロミクス
 研究課題名（英文） Metabolomics on stress responses in plants for production of useful secondary metabolites

研究代表者
 馬場 健史（BAMBA TAKESHI）
 大阪大学・大学院工学研究科・准教授
 研究者番号：10432444

研究成果の概要：

当該研究では、抗酸化反応という視点から環境ストレス応答反応における二次代謝の代謝変動解析を行った。二次代謝物質として強い生理活性を有し医薬品原料として利用されているアルカロイドに注目し、ニチニチソウ、ペラドンナ等を実験植物として環境ストレスに対する代謝変動解析に取り組んだ。まず、それぞれの植物体において一次代謝物および二次代謝物を精密に解析するための植物材料ならびに代謝分析手法の構築を行った。構築した代謝解析系を用いて環境ストレス負荷に対する代謝変動解析を試みた。変動が顕著な代謝物を同定し、アルカロイドを中心とした各代謝物の相関関係を解析した結果、ストレスに対して挙動を共にする代謝物群を同定した。また、当該代謝解析系を用いて他の植物においても応用研究を行い、各種代謝物における環境ストレスによる変動を確認した。当該研究により植物の二次代謝とストレス応答反応の関係が明らかになり、有用二次代謝産物の生産に向けた基礎的な知見が取得できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，生物機能・バイオプロセス

キーワード：メタボロミクス，二次代謝，植物，酸化ストレス

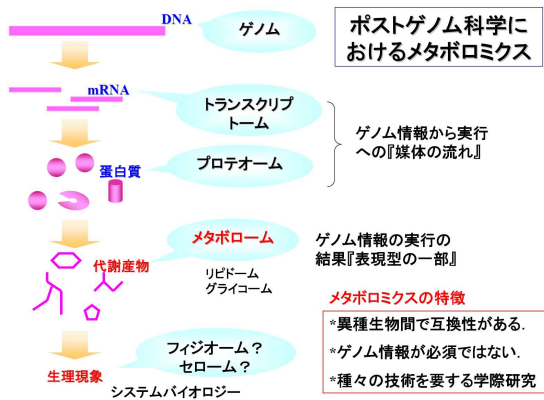
1. 研究開始当初の背景

植物の産生する二次代謝産物は、医薬品、工業原料など様々な素材として幅広い分野で利用されている。これまで、植物の二次代謝については、生産性に観点を置いた研究が中心で、その生理的意義については議論され

てこなかった。ほとんど恒常的に受ける環境ストレス（酸化ストレス）からの防御反応、すなわち、活性酸素消去のための抗酸化反応の結果として二次代謝物が生成すると考えると、各代謝物の酸化還元電位の変化を合理的に説明ができる。したがって、植物は種々

の酸化ストレスに対応するために、最終二次代謝物質の前駆体である抗酸化物質を生産し、それらが酸化されることによる生体防御機構を構築していると考えられる。また、一方で植物におけるストレス応答については、遺伝子レベルでの詳細に調べられているものの、代謝変動については網羅的な解析は行われていない。

メタボロミクスは、ゲノム情報が転写、翻訳過程を経て実行された表現型の一部である『メタボローム（代謝物総体）』が解析対象であるため、上流のプロテオームおよびトランスクリプトームといったゲノム情報の媒体の流れを見ることでは解明できない生体反応の解析が可能である（下図）。そこで、当該研究では、このメタボロミクスの技術を効果的に利用し、酸化ストレスに対する抗酸化反応という観点から植物の二次代謝をとらえ、ストレス応答および二次代謝に関する新知見の取得を試みた。



2. 研究の目的

当該研究は、植物の二次代謝物質を種々の環境ストレスを受けることにより発生する活性酸素除去のための抗酸化反応の生成物と位置づけ、植物の産生するアルカロイドを解析対象の二次代謝物として、ストレス応答と二次代謝の関連を解析することを目的とする。植物アルカロイドの生合成に関する研究については、これまでに数多くの報告がある。様々な摂動（環境ストレス、エリシター等）を与えた際の最終産物である生理活性物質の含量の変動については調べられているが、上流の代謝物やその他の代謝との関連性については、詳細には調べられていない。また、これまでに酸化ストレス緩和という観点から、代謝変動を解析している例はない。当該研究において、メタボロミクスにより代謝物を網羅的に解析することによりストレス応答のメカニズムに関する代謝レベルでの新知見の取得が期待できる。また、活性酸素に対する抗酸化反応は植物以外の生物に共通する重要な防御反応であることから、ストレ

ス応答のメカニズムに関する代謝レベルでの基礎的な知見を得られる当該研究は、学術分野においても応用分野においても非常に重要な研究である。

さらに、当該研究において、ストレスに対する応答反応のメカニズムを代謝レベルで明らかにすることにより、有用な二次代謝の生産を目的とした栽培・育種方法や組換え植物の作出などの生産技術開発に寄与する知見が得られる。例えば、ニチニチソウにおいては熱帯産のものが有効成分の含量が高いといわれているが、まさに、環境ストレスによる代謝変動を解析することにより、産地による生産性の違い要因について明らかにすることができ、高生産、安定生産を目的とした育種栽培技術の構築が可能になる。また、当該研究において蓄積するストレス応答解析に軸をおいた二次代謝物質の生産技術は、他の有用二次代謝物質の生産技術開発に直接に応用できる。

3. 研究の方法

(1) アルカロイド産生植物における代謝変動解析のため技術構築

まず、それぞれの植物における二次代謝物の分析系の構築を試みた。ニチニチソウにおいては、前駆体である catharanthine, vindoline とその酸化重合物である二量体アルカロイドの vinblastine, anhydrovinblastine, leurosine の分析系の構築を試みた。また、ペラドンナにおいては、トロパンアルカロイドである hyoscyamine や scopolamine の分析系の構築を試みた。また、糖、アミノ酸、有機酸等の低分子一次代謝物については、これまでのメタボロミクス研究において構築した GC-MS および CE-MS を用いた手法を適用した。また、実験に用いる材料として、それぞれの植物体以外に、ニチニチソウにおいてはアルカロイドの産生能が高い系統のシュートカルチャー培養系および植物体への順化系を、また、ペラドンナにおいては、毛状根の培養系を構築し、当該研究に耐えうる植物材料の準備をした。

上記を統合的シストレス応答反応を代謝レベルで精密解析に耐えうる手法の構築を行った。さらに、¹⁵N 無機窒素塩を含む培地で生育させることによってアルカロイド関連代謝物を *in vivo* ラベリングする培養系を構築し、アルカロイド関連化合物の精密解析が可能安定同位体希釈法によるメタボローム解析系の構築を試みた。

(2) 環境ストレス負荷における代謝変動解析

上記手法を用いてニチニチソウおよびペラドンナ等においてストレス応答の体レベルでの変動解析を試みた。また、当該代謝解析方法を用いた応用研究として、シロイヌナズナ、緑茶や生薬植物であるであるトウキなどについても、同様に解析を試みた。

4. 研究成果

(1) アルカロイド産生植物における代謝変動解析のため技術構築

まず、前駆体である catharanthine, vindoline とその酸化重合体である二量体アルカロイドの vinblastine, anhydrovinblastine, leurosine の分析系の構築を試み、蛍光検出器を用いることにより HPLC での高感度定量分析系の構築に成功した。また、ペラドンナにおいては、トロパンアルカロイドである hyoscyamine や scopolamine の分析については、超高速液体クロマトグラフィー-三連四重極質量分析 (UPLC-MS/MS) を用いた高感度の定量分析系を構築した。最終的に上記二次代謝物とメタボロミクス的手法を適用した一次代謝物とを統合的に解析できるシステムを構築した。

また、当該実験に用いる植物体およびアルカロイドの産生能が高い系統のシュートカルチャー培養系および植物体への順化系を構築し、当該研究に耐えうる植物材料の準備をした。さらに、各種環境ストレスの負荷方法および代謝物の抽出・精製方法など再現性および精度の高いデータを取得するための各種条件の検討を行い、ストレス応答反応の代謝レベルでの精密解析に耐えうる手法の構築を行った。また、あわせて ^{15}N 無機塩を用い安定同位体希釈法による各種アルカロイドならびに関連代謝物の *in vivo* ラベリングによる精密分析法の構築に取り組み、従来の内部標準物質添加法に比べて精度の高い代謝解析法が可能になった。また、当該手法はラベル化の経時変化を調べることで代謝物のターンオーバーやフラックス解析にも対応可能である。

(2) 環境ストレス負荷における代謝変動解析

当該研究において構築した代謝解析系を用いて、ニチニチソウ葉における解析を行ったところ、光酸化ストレス（近紫外光照射）により前駆体の含量が大きく減少し、二量体の増加が確認された。さらに、低温条件下（4℃）でも同様の現象が認められた（右上図）ことから、当該反応は非酵素的にも進行することが明らかになった。

また、ニチニチソウの懸濁培養細胞を用いて、ストレス負荷に対する代謝変動解析を試みた。MeJA 処理を施した培養細胞では、ajmalicine の蓄積量が増加した処理後 24~48 時間に TCA 回路中の有機酸や一部のアミノ酸、糖リン酸の蓄積量の増加が見られた。

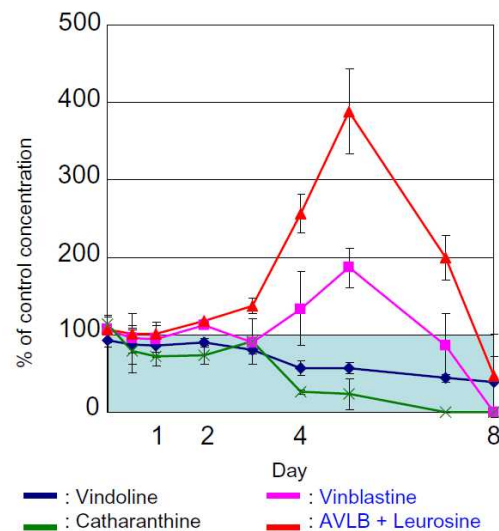


図 近紫外光照射条件下におけるニチニチソウ葉におけるアルカロイドの変動 (4℃)

一方で MeJA 処理したサンプルでは、コントロールでは見られた putrescine の蓄積量の増加は見られず、putrescine の消費が促進されている、あるいはその合成が抑制されているという 2 つの可能性が考えられた。そこで同実験系において、 ^{15}N 標識化された硝酸アンモニウム溶液を MeJA と同時に培地へ添加することで *in vivo* ^{15}N 安定同位体標識化を行い、代謝産物の ^{15}N 標識率を測定した。その結果、MeJA 処理を施した培養細胞では、コントロールと比較して putrescine の ^{15}N 標識率が低く、putrescine の生合成が抑制されていることが明らかとなった（下図）。

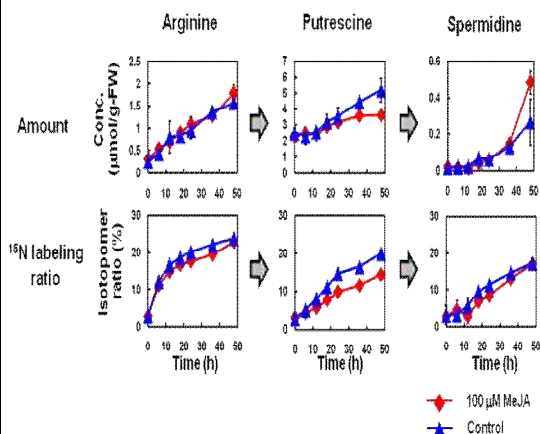


図 putrescine 周辺代謝物の蓄積量と ^{15}N 標識率の経時変化

その他に、ペラドンナを用いて、パラコト、MeJA 処理等を行い、トロパンアルカロイド生合成経路代謝物および関連一次代謝物の解析を行い、ペントースリン酸経路の中間体 (ribulose 5-phosphate, sedoheptulose 7-phosphate など) は濃度依存的に蓄積量が増加していることや MeJA 処理により

glutamine の ¹⁵N 標識率が減少し,それに伴って tropine や hyoscyamine の ¹⁵N 標識率も低下するなど,アミノ酸の代謝において大きな変動が認められた.

さらに,当該研究の応用研究として,シロイヌナズナにおける光応答反応についても解析し,ストレス応答物質であるポリアミン生合成系が活性化されることが明らかになった.また,緑茶や生薬植物であるトウキの代謝プロファイリングを行い,各種代謝物における環境ストレスによる変動が確認された.当該研究により植物の二次代謝とストレス応答反応の関係が明らかになり,有用二次代謝産物の生産に向けた基礎的な知見が取得できた.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

馬場健史, 福崎英一郎, メタボロミクスの実際の運用に向けて-メタボロミクス技術動向と可能性. 未来材料, 9, 52-59 (2009). (査読無)

Jumtee, K., Bamba, T., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Integrated metabolite and gene expression profiling revealing phytochrome A regulation of polyamine biosynthesis of Arabidopsis thaliana. J. Exp. Bot., 59, 1187-1200 (2008). (査読有)

Tianniam, S., Tarachiwin, L., Bamba, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E., Metabolic profiling of Angelica acutiloba roots utilizing gas chromatography time-of-flight mass spectrometry for quality assessment based on cultivation area and cultivar via multivariate pattern recognition. J. Biosci. Bioeng., 105, 655-659 (2008). (査読有)

Pongsuwan, W., Bamba, T., Harada, K., Yonetani, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E., A high throughput technique for comprehensive analysis of Japanese Green Tea Quality Assessment Utilizing UPLC/TOF MS. J. Agric. Food. Chem., 56, 10705-10708 (2008). (査読有)

福崎英一郎, 馬場健史, メタボロミクス(代謝物総体解析)の原理と食品工学への応用. FFI ジャーナル, 212(5), 380-388 (2007). (査読無)

[学会発表](計8件)

国際

Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E., Quality assessment of Japanese green tea, Camellia sinensis by means of metabolic fingerprinting. 5th International Conference of Plant Metabolomics, 2008/7, Pacifico Yokohama.

Tianniam, S., Bamba, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E., Quality assessment of Angelica acutiloba roots through the application of metabolomics. 5th International Conference of Plant Metabolomics, 2008/7, Pacifico Yokohama.

国内

馬場健史, メタボロミクスの技術開発, 第2回創薬とイメージングに関するシンポジウム, 大阪大学, 2009/2. (invited).

Jumtee, K., Bamba, T., Okazawa, A., Fukusaki, E., Kobayashi, A., Integrated metabolic profiling and gene expression profiling revealing phytochrome A regulation of polyamine biosynthesis of Arabidopsis thaliana. 日本植物細胞分子生物学会(大阪)大会・シンポジウム, 2008/9, 大阪大学工学研究科吹田キャンパス.

浅野麻実子, 藤本真梨子, 原田和生, 吉川友章, 馬場健史, 平田 收正. 近紫外光照射下でのニチニチソウにおける抗腫瘍性二量体アルカロイド生合成機構の解析. 日本植物細胞分子生物学会(大阪)大会・シンポジウム, 2008/9, 大阪大学工学研究科吹田キャンパス.

石田洋基, 松原惇起, 馬場健史, 原田和生, 福崎 英一郎, 平田 收正. 微細藻類におけるストレス応答物質の機能解析 緑藻 Chlamydomonas reinhardtii のアブシジン産生合成経路の解析. 第60回日本生物工学会大会, 2008/8, 東北学院大学土樋キャンパス.

浅野麻実子, 馬場健史, 福崎 英一郎, 平田 收正, 近紫外光照射下でのニチニチソウにおける抗腫瘍性二量体アルカロイド生合成機構の解析, 2007/9, 広島大学東広島キャンパス.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 健史 (BAMBA TAKESHI)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 10432444

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

・福崎 英一郎 (FUKUSAKI EIICHIRO)
大阪大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 40273594

・平田 收正 (HIRATA KAZUMASA)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 30199062