

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25113010

研究課題名(和文)植物個体発生を支える代謝ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of metabolic network underlying plant development

研究代表者

平井 優美(Hirai, Masami)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90415274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 113,900,000円

研究成果の概要(和文)：代謝は生命現象の基盤であるが、代謝ネットワークのダイナミクスおよび個体発生における役割についての理解は不十分である。本研究は、メタボロミクスを駆使し、数理解析によって植物代謝システムのダイナミクスを理解すること、および分子遺伝学的手法によって発生過程を制御する代謝経路を明らかにすることを目的とした。理論構築とその適用、予測と検証などの数理的手法と生物学的実験を組み合わせた研究を行なって、いくつかの発生過程の原理を明らかにした。また、分子遺伝学的手法による研究を行ない、代謝酵素CYP77A4が関与する代謝経路がシロイヌナズナ胚のパターニングを制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代謝が発生過程を制御するという概念を導入することで、発生生物学および代謝生理学における新たな研究戦略を確立した。また、数理的手法を取り入れることで、発生と代謝のダイナミクスの解明を可能とした。

研究成果の概要(英文)：Metabolism is a basis of life, but its dynamics and regulatory function in development have not been fully understood. In this study, we aimed to understand the dynamics of plant metabolic system via a mathematical approach, and to identify metabolic pathways that regulate developmental processes by molecular genetics. We performed integrated mathematical and biological studies, i.e., theory construction and its application, and, prediction and confirmation, which have led to understanding of several developmental processes. We also clarified by a molecular genetic approach that a metabolic enzyme CYP77A4-mediated metabolic pathway regulates patterning of Arabidopsis embryo.

研究分野：植物代謝生理

キーワード：代謝ネットワーク 発生 メタボロミクス 数理モデリング 分子遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代謝は生命の基盤となる動的現象である。2000年代初頭からのメタボロミクスをはじめとするオミクス研究によって代謝のシステムの理解について一定の進捗を見たものの、動的な振る舞いの中から恒常性を生み出す代謝のダイナミクスに対する理解は不十分であり、数理モデルによる解析が必須と考えられた。

一方、動植物の発生現象の解明においては分子遺伝学が力を発揮し、形態異常を示す変異体の原因遺伝子として転写制御や情報伝達に関わる多数の遺伝子が同定されてきた。だが、原因遺伝子が代謝に関わるものであった場合には、積極的な解析の対象とはされてこなかった。また、形態異常の変異体における代謝産物プロファイルが野生型と異なっているにもかかわらず、「形が違えば中身も違って当たり前」と見なされがちであった。こうした考え方のバイアスは「代謝による発生の制御」という視点の欠如によるものである。しかしながら、発生過程と代謝とは間接的・二次的な関係ではなく、緊密な直接的関係のもとで相互に制御しあっていることは十分に予想され、こうした視点からの研究が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、これまで独立な現象であるかのように別々に研究されてきた「発生」と「代謝」に対して、それらの間に緊密に相互作用しあう制御関係が存在することを示すことを目的とした。具体的には、メタボロミクス、数理モデリング、分子遺伝学を駆使して植物発生システムの観点から代謝システムをダイナミクスとして理解すると同時に、植物発生ロジックの解明に代謝研究の視点から貢献することを目指した。植物の各器官を器官たらしめる代謝ネットワークを解明し、代謝と発生がいかにリンクして相互に影響し合っているのかを分子レベルで解き明かすこと、および、植物形態形成機構を力学系モデルを用いて数理的に解明することを目指した。

3. 研究の方法

研究項目 発生プロセスにおける代謝ネットワークの数理的解明

本研究領域の他の班員と連携して、植物の発生に関わる現象や変異体についてのメタボローム解析を行なう。各発生過程に特徴的な代謝プロファイルを時系列解析して数理モデル化し、各発生過程を支える代謝ネットワークを明らかにする。また研究分担者の望月が開発した Linkage logic を用いて、システム全体のダイナミクスを捉えるための分子を決定し、既知のネットワークと計測されたダイナミクスとの比較から、未知の制御を予測する。

研究項目 代謝変異体解析から迫る発生の分子基盤

シロイヌナズナの代謝関連遺伝子のうちで機能未知のものに絞り、その機能欠損変異体について、さまざまな形態的表現型に着目したスクリーニングを行う。得られた変異体のメタボローム解析や分子生物学的、生化学的解析等を行うことにより、例えば葉の発生に関わる新規代謝経路を見いだしてその生理機能を同定するなど、特定の発生過程に関わる代謝の分子基盤を解明する。

4. 研究成果

以下に代表的な成果を示す。

(1) 胚発生に関わるチトクロム P450 の同定と生理機能解明

発生を制御する代謝経路の発見を目的として、シロイヌナズナのチトクロム P450 機能破壊株を収集し、葉の形や根の長さなどの形態的表現型を定量的に解析した。そのうちの1つの破壊株である *cyp77a4* 株では、オーキシン関連変異体に似た子葉のパターニング異常が見られた(図1)。マーカー遺伝子を用いた詳細な解析により、*cyp77a4* 株では胚においてのみオーキシン応答性に異常が認められることが分かった。また CYP77A4 タンパク質は小胞体に関連する膜に局在することが分かった。CYP77A4 は *in vitro* で脂肪酸のエポキシ化に関与するという既報も考慮し、CYP77A4 を介した代謝経路が胚における極性の形成に寄与していると結論した(Kawade, Li, et al., 2018)。

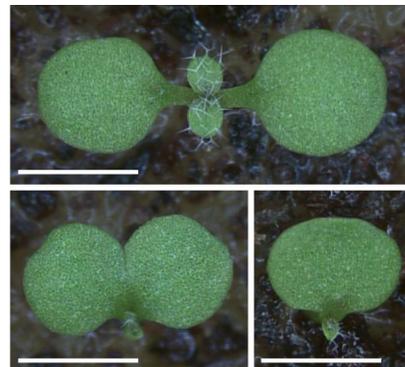


図1 *cyp77a4* 株における子葉のパターニング異常

(上段) 発芽後7日目の野生型株の実生

(下段) 発芽後7日目の *cyp77a4* 株の実生

図中の白線は2mmを示す。

(2) 倍数体植物における代謝産物蓄積のメタボロミクスによる解明

倍数体の植物ではしばしば代謝産物蓄積量が増加しているが、これが倍数化の直接の影響なのか否かは未解明であった。そこで、東大・塚谷博士と共同で、コルヒチン処理によりシロイヌナズナを4倍体化してメタボローム解析を行った。異なる栽培条件で育てた植物体のロゼツ

ト葉、およびさまざまなステージのセイヨウナシ果実のメタボロームの比較から、倍数化による代謝産物蓄積の変化は生物種、生理条件、器官に強く依存することが分かった (Tsukaya et al. 2015)。また、シロイヌナズナ種子 1 粒でのメタボローム分析系を確立し、シロイヌナズナの Col-0 ほかに 2 つのアクセッションを用いて 4 倍体のメタボロームを比較解析したところ、体積当たりのグルコシノレート量がアクセッションに共通して倍数化により増加することが分かった (Sawada et al. 2017)。さらに、野生および人為的に作出した 4 倍体シロイヌナズナのメタボロームを 2 倍体のものと比較し、代謝プロファイルの違いを地理的起源と進化の観点から明らかにした (Vergara et al. 2017)。

(3) 数理解析による発生過程と代謝のダイナミクスの解明

化学反応ネットワークの構造から、酵素活性の変化に対する代謝産物濃度の応答を予測する数理理論を開発した (Okada & Mochizuki, 2016)。これを用いて、スクロース合成におけるピロリン酸過剰蓄積の効果を、学芸大・Ferjani 博士らとの共同研究で進めた。ラクトース合成経路のメタボローム解析と理論を組み合わせることで未知の化学反応の存在を予測し、また生体内で過剰なピロリン酸が UDP-グルコースピロホスホリラーゼを阻害することを明らかにした。 (Ferjani et al. 2018)。

遺伝研・小田博士との共同研究により、導管細胞の表層微小管の周期パターン形成メカニズムを実験と数理モデルの組み合わせにより解明した。周期パターン形成を実現する数理的条件を求め、必要な分子間相互作用を予測した (Nagashima et al. 2018)。

陸上植物の平坦葉の形成機構について、従来の仮説では、葉の周縁部において adaxial 側と abaxial 側の境界で細胞分裂が高頻度で起これば平坦葉が自然に形成される、と考えられていた。この仮説を検証するために、葉の裏表遺伝子のダイナミクス (ODE Model) と、細胞分裂による細胞と組織の変形のダイナミクス (Vertex Model) を組み合わせ、葉の形態形成をモデル化した。数値計算の結果、従来の仮説だけでは平坦葉を作るには不十分であることが分かった。細胞分裂の方向が制御されることで、平坦葉の成功率は飛躍的に向上することを示した (Hayakawa et al. 2016)。

バイオケミカルシステム理論を駆使して、時系列メタボロームデータを用いてゲノムスケールに代謝を数理モデル化する手法を確立した (Sriyudthsak, Shiraiishi, et al. 2016)。さらに、生物学者が容易に数理解析に取り組みやすくなるようにするため、高度に専門的な知識を要せずに時系列メタボロームデータを用いて代謝の数理解析を行なうためのウェブツールとして PASMnet (Prediction, Analysis and Simulation of Metabolic networks) を開発し (Sriyudthsak, Mejjia, et al. 2016) (図 2) 国内外からの多数の利用があった。



図 2 代謝の数理解析用ウェブツール PASMnet の概念図

(4) セリン生合成経路の制御機構の解明

アミノ酸のセリンはタンパク質構成成分であるのみならず、核酸や脂質などの重要な生体分子の前駆体でもあり、動植物の発生において不可欠な役割を担っている。植物の 3 つのセリン生合成経路のうち、生物種を超えて保存されているリン酸化経路の初発酵素である 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PGDH) は、シロイヌナズナでは 3 つの遺伝子 *AtPGDH1*, 2, 3 にコードされる。本研究では、*AtPGDH1* および *AtPGDH3* の酵素活性はセリンによるフィードバック阻害のほか、ホモシステインなど 5 種のアミノ酸による活性化を受けることを示した (Okamura & Hirai, 2017) (図 3)。また、京都大・河内博士、西浜博士との共同研究により、ゼニゴケでは同酵素は 1 遺伝子 *MpPGDH1* によってコードされ、その活性は *AtPGDH1* および *AtPGDH3* と同様にセリンによる阻害と 5 種のアミノ酸による活性化を受けることを明らかにした (Akashi, Okamura, et al. 2018)。また、イネやヒメツリガネゴケなど代表的なモデル陸上植物における PGDH について、アミノ酸による活性制御の有無を明らかにした (投稿準備中)。

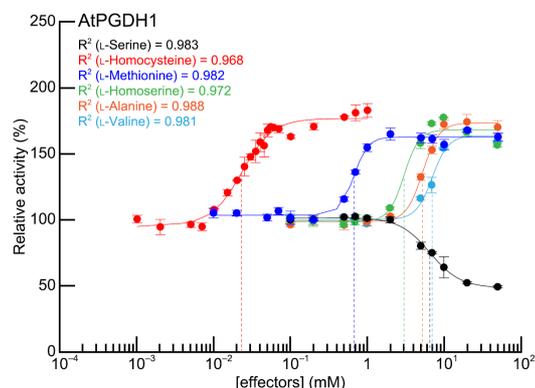


図 3 *AtPGDH1* 活性のセリン、ホモシステイン、メチオニン、ホモセリン、アラニン、バリンに対する用量反応曲線

本研究は、代謝が制御する発生過程があるという仮説の下で、代謝酵素に欠損を持つ変異体の収集とその形態的表現型の定量的解析を行なった。このような代謝と発生の接点を探る研究は世界的にも例がなく、論文査読過程ではこの研究戦略も高く評価された。この研究により、シロイヌナズナ胚の子葉（双葉）を正しく2枚生じさせるのに必要な酵素を同定した。このように、上記の仮説と方法論の妥当性が証明されたことで、今後は同様の手法によって発生を制御する代謝経路が他にも多く見つかることが期待される。また本研究では、理論構築とその適用 (Ferjani et al. 2018; Sriyudthsak, Shiraishi et al. 2016) や、予測と検証 (Nagashima et al. 2018; Sriyudthsak et al. 再投稿準備中) など、数理的手法と実験を組み合わせる研究を多面的に行なった。今後は、数理モデルの精緻化のためにメタボローム解析の定量性の改善が望まれるとともに、半定量的大規模データを利用するためのアルゴリズム開発も重要である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 33 件)

- Kawade K, Li Y, Koga H, Sawada Y, Okamoto M, Kuwahara A, Tsukaya H, Hirai MY (2018) The cytochrome P450 CYP77A4 is involved in auxin-mediated patterning of the *Arabidopsis thaliana* embryo. *Development*, 145: 168369. 査読有 doi: 10.1242/dev.168369
- Akashi H, Okamura E, Nishihama R, Kohchi T, Hirai MY (2018) Identification and biochemical characterization of the serine biosynthetic enzyme 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Marchantia polymorpha*. *Front. Plant Sci.* 9: 956. 査読有 doi: 10.3389/fpls.2018.00956
- Ferjani A, Kawade K, Asaoka M, Oikawa A, Okada T, Mochizuki A, Maeshima M, Hirai MY, Saito K, Tsukaya H. (2018) Pyrophosphate inhibits gluconeogenesis by restricting UDP-glucose formation *in vivo*. *Sci. Rep.* 8: 14696. 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-32894-1
- Nagashima Y, Tsugawa S, Mochizuki A, Sasaki T, Fukuda H, Oda Y. (2018) A Rho-based reaction-diffusion system governs cell wall patterning in metaxylem vessels. *Sci. Rep.* 8: 11542. 査読有 doi: 10.1038/s41598-018-29543-y
- Okamura E, Hirai MY (2017) Novel regulatory mechanism of serine biosynthesis associated with 3-phosphoglycerate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* 7: 3533. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-03807-5
- Sawada Y, Tsukaya H, Li Y, Sato M, Kawade K, Hirai MY (2017) A novel method for single-grain-based metabolic profiling of *Arabidopsis* seed. *Metabolomics* 13: 75. 査読有 doi: 10.1007/s11306-017-1211-1
- Vergara F, Rymen B, Kuwahara A, Sawada Y, Sato M, Hirai MY (2017) Autopolyploidization, geographic origin, and metabolome evolution in *Arabidopsis thaliana*. *Am. J. Bot.* 104: 905-91. 査読有 doi: 10.3732/ajb.1600419
- Sriyudthsak K, Mejia RF, Arita M, Hirai MY (2016) PASMET: a web-based platform for prediction, modelling and analyses of metabolic systems. *Nucl. Acids Res.* 44: W205-211. 査読有 doi: 10.1093/nar/gkw415
- Okada T, Mochizuki A (2016) Law of localization in chemical reaction networks. *Phys. Rev. Lett.* 117: 048101. 査読有 doi: 10.1103/PhysRevLett.117.048101
- Sriyudthsak K, Shiraishi F, Hirai MY (2016) Mathematical modeling and dynamic simulation of metabolic reaction systems using metabolome time series data. *Front. Mol. Biosci.* 3: 15. 査読有 doi: 10.3389/fmolb.2016.00015
- Hayakawa Y, Tachikawa M, Mochizuki A (2016) Flat leaf formation realized by cell-division control and mutual recessive gene regulation. *J. Theor. Biol.* 404: 206-214. 査読有 doi: 10.1016/j.jtbi.2016.06.005
- Tsukaya, H., Sawada, Y., Oikawa, A., Shiratake, K., Isuzugawa, K., Saito, K. Hirai, M.Y. (2015) Intraspecific comparative analyses of metabolites between diploid and tetraploid *Arabidopsis thaliana* and *Pyrus communis*. *New Negatives in Plant Science*. **1-2**, 53-61 査読有 doi: 10.1016/j.neps.2015.06.001

〔学会発表〕(計 41 件)

川出健介ほか「脂肪酸エポキシ化酵素による胚のパターン形成制御」2018年3月28-30日 第59回日本植物生理学会年会 (札幌)

Kansuporn Sriyudthsak "Understanding of entire plant metabolism in response to environmental stresses via genome-scale mathematical model" July 13, 2017 Eco-Engineering Symposium 2017: Application of Technology for Sustainability of Natural Resources (Bangkok)

Masami Yokota Hirai "Metabolomics-based studies for understanding of plant metabolism." July 10, 2017 Global Biotechnology Congress 2017 (Boston) **招待講演**

Masami Yokota Hirai "Studies for understanding the regulation of amino acid biosynthesis." November 5, 2017. Taiwan-Japan Plant Biology 2017. Taipei. **招待講演**

Masami Yokota Hirai "Understanding of plant metabolism via metabolomics-based mathematical modeling." December 15, 2014. GIW/ISCB-Asia 2014. (Tokyo) **Keynote Speaker**

〔図書〕(計 1 件)

平井優美 (分担執筆) 放送大学教育振興会、改訂版 植物の科学、2015

〔その他〕

ホームページ

理化学研究所 代謝システム研究チーム
<http://metabolicsystem.riken.jp/>

新聞報道 (計 1 件)

2017年10月6日 日刊工業新聞「植物細胞の成長調節 ランダム現象」

プレスリリース (計 6 件)

植物の双葉を2枚にする酵素を発見

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180913_1/ 2018年9月13日

植物細胞の大きさを決めるサイコロゲームを発見

<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2017/09/20.html> 2017年9月20日

シンプルな物理現象「拡散」で葉の形や大きさが決まる仕組みを解明

<http://www.nibb.ac.jp/pressroom/news/2017/09/06.html> 2017年9月6日

セリン生合成の新しい制御機構を発見

http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170614_2/ 2017年6月14日

代謝シミュレーションを簡便に行うツールを開発

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161226_1/ 2016年12月26日

化学反応ネットワークの新原理「限局則」を発見

http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160721_1/ 2016年7月21日

アウトリーチ活動 (計 6 件)

平井優美、日本植物細胞分子生物学会 市民公開シンポジウム、2016年9月3日

受賞 (計 6 件)

澤田有司 2016年度 理研 研究奨励賞・技術奨励賞

平井優美 Highly Cited Researchers 2015 (トムソンロイター社) 2016年2月17日

平井優美 Highly Cited Researchers 2014 (トムソンロイター社) 2014年6月18日

川出健介 2015年度 基礎生物学研究所 若手研究者賞 「発生現象を駆動/維持する代謝システムの解明」

川出健介 2013年度 理化学研究所 基礎科学特別研究員 成果発表会 ポスター賞 (医科学分野) "Homeostasis of organ functions modulated by amino acid metabolism"

川出健介 2013年度 日本植物形態学会 平瀬賞 "ANGUSTIFOLIA3 signaling coordinates proliferation between clonally distinct cells in leaves"

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：望月 敦史

ローマ字氏名：MOCHIZUKI Atsushi

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：開拓研究本部

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：10304726

研究分担者氏名：及川 彰

ローマ字氏名：OIKAWA Akira

所属研究機関名：山形大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50442934

(2)研究協力者

研究協力者氏名：澤田 有司

ローマ字氏名：SAWADA Yuji

研究協力者氏名：李 一蒙

ローマ字氏名：LI Yimeng

研究協力者氏名：境 祐二

ローマ字氏名：SAKAI Yuji

研究協力者氏名：シユタサ カンスポーン

ローマ字氏名：SRIYUDTHSAK Kansuporn

研究協力者氏名：岡村 英治

ローマ字氏名：OKAMURA Eiji

研究協力者氏名：川出 健介

ローマ字氏名：KAWADE Kensuke

研究協力者氏名：ベルガラ フレッド

ローマ字氏名：VERGARA Fredd

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。