

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 13 日現在

機関番号：82111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22710230
 研究課題名（和文）多次元核磁気共鳴法によるメタローム解析を基盤とするイネの代謝解析研究
 研究課題名（英文）Metabolite profiling in rice plant by Multidimensional NMR-Based Metabolomics
 研究代表者
 関山 恭代（SEKIYAMA YASUYO）
 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・食品総合研究所・食品分析研究領域・任期付研究員
 研究者番号：60342804

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、安定同位体標識と多次元核磁気共鳴（NMR）法を我が国の基幹作物であるイネのメタボローム解析に展開し、未同定代謝物のアノテーション（NMR シグナルに対し、化合物情報を付加すること）の情報を増加させることを目的とした。そのためには、イネを ^{13}C で高度に標識し、検出感度を上げ必要がある。そこでイネへの $^{13}\text{CO}_2$ の投与条件を改良し、75%という高標識率を達成し、葉に含まれる水溶性代謝物 135 種類、メタノール可溶性代謝物として 164 種類の候補代謝物をリストアップした。

研究成果の概要（英文）： ^{13}C labeling allows to increase the reliability of metabolite annotation. In an attempt to expand information on metabolite profiles in *Oryza sativa*, I tried to generate highly ^{13}C -labeled rice plants by $^{13}\text{CO}_2$ feeding. The labeling ratio of the labeled plant estimated from the anomeric proton signal of sucrose in the ^1H NMR spectra was 75%. Candidate polar and semipolar metabolites in the leaves were listed from the standard database.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：機器分析、メタボローム解析、核磁気共鳴法、安定同位体標識

1. 研究開始当初の背景

(1) 代謝物は、生体内における各種プロセスの構成要素として重要な役割を担っている。メタボロームは、細胞または生体内における代謝物の総体と定義され、数の多さや化学的多様性の面で、ゲノムやプロテオームよりもはるかに複雑だと言われる。現在のメタボローム解析における計測法は、検出感度やスループットを重視した質量分析（MS）が世界動

向の主流となっている。分析機器の急速な性能の向上により、メタボローム解析は創薬・食品・環境・エネルギー分野など多方面における産業にも広く応用される様になった。分析機器の性能の向上により検出シグナル数が増え、世界規模で代謝物データベースの整備も進んでいる一方で、未だに同定率が低いことはメタボローム研究分野における大きな課題となっている。今後の更なる発展を推

進するためには、未同定代謝物の解析を積極的に行ない、化合物レベルでのブラックボックスに切り込むことが必須である。

(2)代謝物シグナルに対し化学的情報を付加する事は「アノテーション」と呼ばれ、一般的には各種スペクトルデータやクロマトグラフィーを標準化合物と比較する事によって行なわれる。標準品が入手困難な未知代謝物についても、組成式や分子量、部分構造情報を付加する事ができれば、代謝ネットワークを解明する手がかりを与える事ができる。構造情報の取得に最も威力を発揮するのは核磁気共鳴(NMR)法であるが、現状では検出感度の低さからMSと比べて活用が立ち後れていると考えられる。NMRでの検出感度を向上させるための有効な方法として、高度に安定同位体標識を施した試料の作成があげられる。

2. 研究の目的

以上の背景から本課題では、我が国の基幹作物であるイネを対象とし、高¹³C標識植物体を作成し、多次元NMR法によってより多くの代謝物シグナルのアノテーション情報の蓄積を行ない、将来的な栽培・育種技術の開発に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネ(日本晴)野生株を¹³C標識二酸化炭素(¹³CO₂)雰囲気下で培養することで、高¹³C標識植物体の作成を試みた。まず図1に示す密閉式アクリルチャンバーの設計・作成を行い、¹³CO₂投与条件の検討を行った。環境条件は、光400 μmol/m²/s、14時間点灯、10時間消灯、温度29℃(点灯時)および、24℃(消灯時)とし、培養液には春日井氏液の一部を変えた水耕液を用いてCO₂ガスの導入試験を行った。播種3日後、子葉鞘および小根が伸長した段階で、チャンバー内の空気を酸素:窒素4:1の混合ガスで完全に置換した後、目的濃度のCO₂ガスを導入し、チャンバー内のCO₂ガス濃度の経時変化を非分散型赤外吸収式二酸化炭素センサーでモニタリングした。非標識CO₂ガスを用いた予備試験により、イネによるCO₂の消費量の経時変化を調べたところ、播種後3週目以降に消費量の増加と乾物重量の大幅な増加が見られることが分かった。

次に、予備試験で確立した投与条件を用いてイネの¹³C標識を行った。標識CO₂(¹³C:¹²C=80:20の混合ガス)を播種後3日目から48日目までの期間にわたって投与した。植物体の乾物重量変化を表1に示す。予備試験で得た知見通り、播種後3週目以降に積極的な二酸化炭素の取り込みが認められた。次に、¹H-NMRスペクトルにおけるショ糖シ

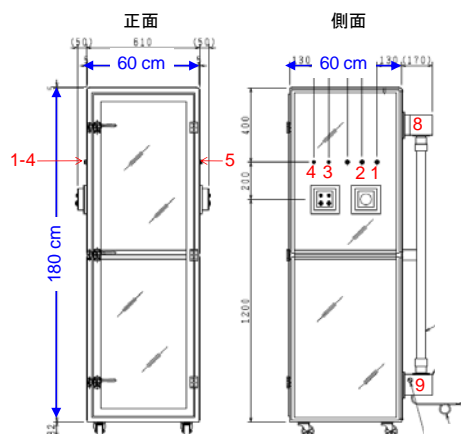


図1. 密閉式アクリルチャンバー(幅60 cm、奥行き60 cm、高さ180 cm、体積648 L)の見取り図(上)およびイネ(日本晴)栽培の様子(下)。1: 窒素ガス導入口、2: 酸素ガス入口、3: 非標識CO₂ガス導入口、4: ¹³CO₂ガス導入口、5: ガス出口、6: 非分散型赤外吸収式二酸化炭素センサー、7: 温室度センサー、8: 換気ファン(チャンバー背面に設置、空気入口)、9: 換気ファン(チャンバー背面に設置、空気出口)。

表1 ¹³CO₂投与によるイネの乾物重量変化

栽培日数(日)	1個体あたりの乾物重量(g)	
	平均値	標準偏差
0	25.6	0.3
21	27.3	3.1
32	78.9	12.5
40	265.8	10.0
48	535.0	39.5

グナルの面積から、¹³C標識率を調べた(図2A)。¹³Cと直接結合したプロトン(¹H)シグナルは、結合定数175 Hzで特徴的な分裂を

示すため、分裂したシグナルの面積から標識率を見積もることができる。その結果、栽培 32 日目 (^{13}C 投与 29 日目) で、75% という高標識率を達成できたことが分かった。葉の水抽出物について、高感度な ^1H - ^{13}C HSQC (heteronuclear single-quantum coherence, 水素と直結した炭素を観測する) スペクトルを計測したところ、非標識試料では約 30 シグナルしか検出できないのに対し、標識試料では 10 倍以上の約 450 シグナルを検出することに成功した (図 2B)。

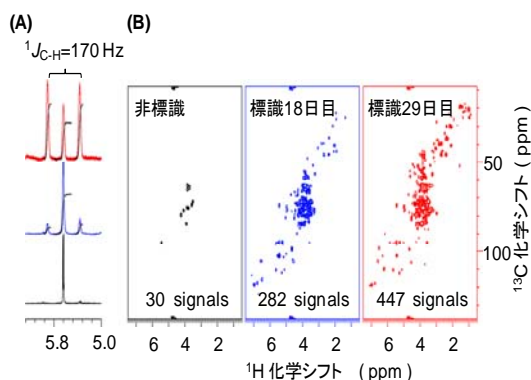


図 3. 日本晴 (葉) リン酸バッファー水溶液抽出物の NMR スペクトル。黒: 非標識サンプル、青: ^{13}C 標識 18 日目のサンプル、赤: ^{13}C 標識 29 日目のサンプル。(A) ^1H -NMR スペクトル (ショ糖シグナルのアノメリックプロトンの拡大)。(B) ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。

次に、標準化学シフトデータベースとの照合により、候補代謝物の探索を行った。大量の NMR シグナルを効率的に標準化学シフトと照合するために、理化学研究所・植物科学研究センター・先端 NMR メタボミクスチームで開発した代謝物同定ソフトウェア、SpinAssign を利用した。まずデータベースに登録されている代謝物の中から、 ^1H の化学シフトの誤差が 0.03 ppm 以内、 ^{13}C 化学シフトの誤差が 0.53 ppm 以内に収まる代謝物を選別した。1 つのシグナルに対し複数の代謝物が重複してヒットする場合には、化学シフトの誤差が最も小さいものを候補とした。また、候補代謝物に必要なシグナルの全てが観測されない場合には、その候補と類似の部分構造を有する代謝物としてアノテーションした。NMR スペクトルにおける化学シフトは、観測するシグナルが置かれた環境 (隣接する官能基の性質や部分構造) を極めて敏感に反映するため、特に未知代謝物の複数のシグナルの化学シフトがある代謝物と合致する場合には、類似した部分構造を有すると推定することができる。リン酸バッファー抽出物の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルからは、水溶性代謝物として糖類、アミノ酸、有機酸など 135 の候補代謝物をリストアップすることに成功した。また、標識

体のメタノールバッファー抽出物についても同様に ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルで解析し、約 577 シグナルを検出し、糖類やアミノ酸に加えてリン脂質、フェノール系代謝物など、合わせて 164 の候補代謝物をリストアップすることに成功した。現在は、リストアップした候補代謝物について、3 次元 HCCH-COSY スペクトルによる構造の確認を行っている。

表 1 日本晴抽出物の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルによる解析のまとめ (栽培 32 日目の葉)

抽出溶媒	$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (100 mM, pH 7.0)	$\text{MeOD}/\text{HEPED-d}_{18}$ (10 mM, pH 7.0)
検出シグナル数	447	577
ヒットシグナル数	231	338
候補代謝物数	135 糖、アミノ酸、有機酸	164 糖、アミノ酸、有機酸 リン脂質、クロロフィル、フェノール性化合物

4. 研究成果

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 2 件)

① Yasuyo Sekiyama, Eisuke Chikayama, Jun Kikuchi, Evaluation of a Semipolar Solvent System as a Step toward Heteronuclear Multidimensional NMR-Based Metabolomics for ^{13}C -Labeled Bacteria, Plants, and Animals, Analytical Chemistry, 査読有, 83, 719-726, 2011.

DOI: 10.1021/ac102097u

② 関山恭代、近山英輔、菊地淳、NMR 計測による生体代謝物情報の抽出、ぶんせき、査読無、2012、2月号、81 - 88.

[学会発表] (計 2 件)

① 関山恭代、NMR 法によるメタボローム解析の現状と農作物解析への応用、総合研究試験研究推進会議 土壌肥料研究会 第 1 分科会「メタボローム解析技術の農業への展開」2012 年 2 月 21 日、つくば

② Yasuyo Sekiyama, Seishi Ikeda, Shogo Tsuda, Nobutaka Someya, Eisuke Chikayama, Jun Kikuchi, Hiroshi Ono, NMR-based metabolite profiling in potato and rice plants, 8th Annual International Meeting

of the Metabolomics Society, June
25th-June 28th, 2012, Washington D.C.

6. 研究組織

研究代表者

関山 恭代 (SEKIYAMA YASUYO)

独立行政法人農業食品産業技術総合研究機
構・食品総合研究所・任期付研究員

研究者番号：60342804