

# マメ科植物の代謝システム解明を目指した 質量分析プラットフォームの構築

澤田有司\*

理化学研究所植物科学研究センター

## Metabolomics Platform for Metabolic Systems Analysis in Leguminous Plant

Yuji SAWADA

RIKEN Plant Science Center, Yokohama 230-0045

### ABSTRACT

Diverse metabolites in seed of leguminous plant are important for physiological functions and commercial values. The achievements of detailed metabolite profiling of seeds have been attracted many researchers in wide range of fields. The seed stocks of experimental model plant and crop plant are available from bioresource center, and the metabolome data of them have great potential to directly elucidate plant metabolic systems. More than 90% metabolites in the plant are still unknown, and the un-targeted metabolomics, which is based on the all detectable metabolite, are major methodology. Unfortunately, the un-targeted metabolomics was not appropriate for the practical analysis of the large-scale samples, because of the huge data processing for the un-known metabolites. Thus, we have established a novel practical methodology for metabolomics to quantify hundreds of targeted metabolites, which are based on the reference data of standard compounds, and the simple data processing and high selectivity/sensitivity represent a significant advance as compared to un-targeted metabolomics. Using the reference data of approx. 700 standard compounds, more than 200 metabolites can be detected in the representative plant. In this study, we established metabolomics platform for leguminous plant. The metabolites accumulation patterns of crop leguminous plants were analyzed using hierarchical clustering and principal component analysis. The quantitative trait locus analysis with metabolites as phenotype was carried out using recombinant inbred line of *Lotus japonicus*. These results can allow us to study the metabolic systems for leguminous plants. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 139-144, 2010.

---

\* 〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

Key words : Metabolomics, widely targeted metabolomics, leguminous plant, LC-MS

近年、マメ科植物のゲノム解読が進み、ダイズ、ミヤコグサ、タルウマゴヤシの全ゲノム情報が公開される予定である<sup>1)</sup>。この結果、マメ科植物でもトランスクリプトームやメタボロームなどのポストゲノム的なオーム解析情報が利用可能になる。さらに、近年の分析機器の向上により代謝産物の一斉解析（メタボローム解析）も可能になりつつある<sup>2,3)</sup>。

トランスクリプトーム、プロテオームの検出対象は、いずれもゲノム配列から予測可能であるが、メタボローム解析ではゲノムに相当する参照データが存在しない。このため、未同定の代謝産物の検出に対応する必要がある。そこで、予め標的を絞らない非ターゲット検出が主に用いられている。この非ターゲット解析では、検出対象以外の情報もすべて取得するため、膨大な検出情報が得られる。この情報から代謝産物の情報を得るために、様々なアルゴリズムが検討されているが、標準的な方法は未確立である。このため大規模な植物バイオリソースの実用的なメタボローム解析手法は存在しなかった。

一方、標的を絞ったターゲット解析では、予め取得した標準化合物の参照情報と検出情報を比較し、代謝産物情報を付与するため、短時間でデータ解析が可能である。著者らはこれまでにアブラナ科植物のアミノ酸およびアミノ酸由来のグルコシノレートのターゲット検出をシロイヌナズナ遺伝子破壊株約3,000ラインに適用し、顕著な代謝産物過剰蓄積変異体を同定している<sup>4)</sup>。

著者らは、大規模解析が可能なターゲット解析をより広範囲の代謝産物に適用するために、約1,000化合物の標準化合物についてタンデム型四重極質量分析装置（TQMS）で高感度検出（Selected reaction monitoring, SRM）の条件を検討し、300化合物の検出が可能でワイドターゲット解析を確立した<sup>5)</sup>。さらに条件検討を重ね、これまでに、高速、高感度、広範囲検出が可能で分析系（分析速度：3,000 インジェクション/週、感度：fmolレベル、広範囲性：合計734化合物）を構築し、これを利用した遺伝子機能の同定に成功している<sup>6,7)</sup>。一方、非ターゲット解析では未同定化合物の網羅的なMS/MS情報<sup>8,9)</sup>が得られている。今後これらの検出情報を利用した超広範囲解析が可能になると考えている。

我々が開発した手法は、現時点で他のオーム解析（ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム）に比べ

て極めて安価かつ高速にデータ取得が可能であるため数千から数万種あるバイオリソースの代謝産物蓄積情報の取得と大規模データの解析が可能になった。

また、非ターゲット解析を用いてきた先行研究では、他のオーム情報にメタボローム情報を付与する統合解析が行われてきた<sup>10,11)</sup>。これに対し、本研究では我々が独自開発したメタボローム技術さらに発展させ、マメ科植物に適用可能なプラットフォームを構築し、代謝産物の蓄積パターンから得られる新知見の発見を試みる。この実用例として市販の豆類の分析およびその代謝産物の蓄積様式によるクラスタリングを試みた。さらに、モデル植物ミヤコグサの組み換え自殖システムを利用したメタボライト量的形質座位 (metabolite quantitative trait locus, mQTL) 解析を行った。

## 方 法

### 植物種子材料

ダイズ、クロマメ、ヒヨコマメ、ウズラマメ、アカレンズマメ、アズキ、キントキマメは、Natural COCOから購入した (<http://www.natural-coco.jp/>)。モデル植物ミヤコグサの野生型系統 (B129, MG20) および組み換え自殖系統 (recombination inbred line, RIL) は、日本大学生物資源科学部の青木俊夫准教授に提供していただいた。

### 植物材料の抽出

市販品の豆類の種子はミルサー IMF800（イワタニ社）で粉末状にした後、5 mgを直径5 mmのジルコニアビーズを1個加えた2 mLチューブ（Assist社）に移した。このチューブに1 mLの抽出バッファー（80% MeOH, 0.1% 蟻酸）を加え、シェイクマスターネオ（Biomedical Science社）で抽出した（1,000 rpm, 5 min）。ミヤコグサは、種子1粒（約5 mg）とビーズ1個加えた2 mLハードチューブ（Biomedical Science社）に移しシェイクマスターネオで破碎した後（1,500 rpm, 10 min）、上記方法で抽出した。

### 抽出物の前処理

抽出液1 mLは、自動分注システム（Microlabstar, ハミルトン社）を利用して500  $\mu$ Lを96 well plateに分注し、同システムのロボットアームで搬送し、乾燥窒素吹き付け型の溶媒乾燥機（Ultra vap, Povair社）で溶媒をドライアップした。さらに同システムで120  $\mu$ LのH<sub>2</sub>Oで再溶解後、384 well filter plate（Watman社）

でフィルターを過した。

### サンプルの分析

抽出サンプルは、既報の条件でUPLC-TQD (Waters社) で分析した<sup>5-7)</sup>。

### データ解析

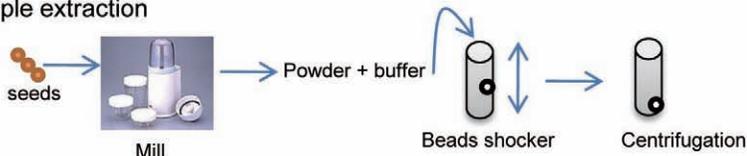
各サンプルの分析結果から得られた代謝産物のピーク面積は、解析ソフトR (<http://www.r-project.org/>) を利用し、欠損値は0.1で置き換え、底2で対数変換し、Z-score化した<sup>5)</sup>。市販の豆類はノーマライズした各Area値を多変量データ解析ソフトTM4 MEV<sup>12)</sup>で階層化クラスタリングし、MEGA4<sup>13)</sup>で系統樹を作成した。同データをRで主成分解析を行い、第一主成分(PC1)と第二主成分(PC2)で各サンプルをプロットした。ミヤコグサの組換え自殖系統は同様のノーマライズ後、RのパッケージRqt<sup>14)</sup>を利用し、QTL解析した。

## 結 果

### 分析プラットフォームの構築

マメ科植物は種子が主な食糧資源である。この代謝産物の蓄積様式を解明するために、本研究では入手可能なマメ科種子のメタボローム解析を行った。まず、作物品種の種子の破碎方法および抽出方法を検討し、分析プラットフォームを構築した (Fig. 1)。作物品種の種子は予めミルサーで粉碎し、秤量した後、ビーズショッカーで抽出することで効率的に分析することができた。一方、モデル植物のミヤコグサは一粒で分析する系を構築し、少量のバイオリソースで簡便に分析できる新規プラットフォームが構築できた。抽出以降の前処理は、自動分注機で行った (Fig. 1)。これらの結果、ハイスループットなサンプル前処理方法が確立できた。この前処理サンプルをUPLC-TQDで

#### a) Sample extraction



#### b) Automated liquid handling system

##### 1. Buffer transfer



(2mL tube / 96 plate > 96 plate)

##### 2. Plate transfer



##### 3. N<sub>2</sub> gas

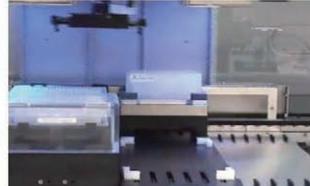


(96 plate)

##### 4. Stage up

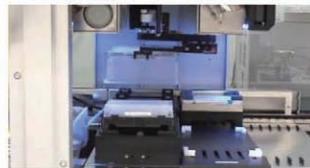


##### 5. Resolution & Vortex



(96 plate)

##### 6. Filtration



(96 plate > 384 filter)

Dry up

#### c) Metabolome analysis



Fig. 1. Platform of LC-MS analysis for seeds of leguminous plants.

分析した。本手法の分析誤差を標準物質で検討した結果、1,000回の試料導入でArea値の誤差は10-20%以内であった。

#### 市販の豆類の代謝産物蓄積パターンの多変量解析

次に、UPLC-TQDによる分析結果を多変量解析した。市販の豆類の分析では、約200化合物の代謝産物がArea値500以上で検出された。ノーマライズ後のデータを階層化クラスタリングした結果、各豆類が代謝産物の蓄積パターンで分類可能であった (Fig. 2)。一方、ダイズ類 (ダイズとクロマメ) およびインゲン豆類 (キントキマメとウズラマメ) は、一部サンプルでクラスが混在した (Fig. 2)。これらのクラスを全体の傾向から調べるために主成分解析を行った結果、同一の豆類が近傍にプロットされ、4つのグループに大別できた (Fig. 3)。この中で遺伝的な系統関係は未解明であるが、赤レンズマメとヒヨコマメが近いグループとして示された。

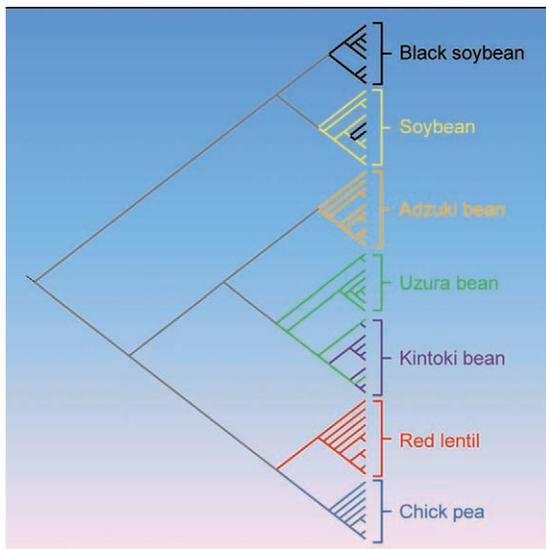


Fig. 2. Hierarchical clustering of crop leguminous plant based on the metabolite accumulation patterns.

#### モデル植物ミヤコグサのmQTL解析

遺伝子組み換えが困難な作物品種では、有用形質を制御する遺伝子座を推定する手法としてQTL解析が行われている。多くのQTL解析では、草丈などの形態変化、開花時期、収量など比較的少数の変数に対して調べられてきた。一方、我々は代謝産物の蓄積様式を数百同時に調べられる。各代謝産物の蓄積様式を独立の表現形質としてQTL解析を行えばこれまで未解明であった、代謝関連遺伝子の推定が可能になると考えられる。そこで、組み換え自殖系統 (RIL) が整備されているモデル植物ミヤコグサのメタボローム解析を行った。本研究で取得した代謝産物情報 (100化合物 x76ライン) と公開されているRILのマーカー情報をQTL解析ソフトR/qtlで解析した結果、多数のQTLが高いLOD値を示した (Fig. 4)。一方、染色体の末端に位置するマーカーでも高いLOD値を示す傾向が見られたが、これらは偽陽性と考えられる。

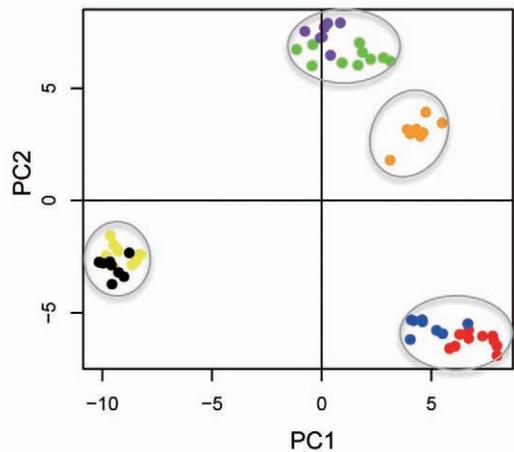


Fig. 3. PCA scores for metabolite profiling data of PC1 and PC2. The samples were showed as filled circles (Red lentil, red; Adzuki bean, orange; Uzura bean, green; Kintoki bean, purple; Black soybean, black; Soybean, yellow; Chick pea, blue).

## 考 察

本研究では大規模なバイオリソースに適用可能なメタボローム解析プラットフォームを構築した。このプラットフォームを利用し、市販の豆類およびモデルマメ科植物ミヤコグサの種子の代謝産物蓄積パターンが解明できた。

既報の比較メタボローム解析では、アブラナ科、マメ科、イネ科の種子を比較し、階層化クラスターリングした結果、これらが独自のクラスを示した<sup>5)</sup>。これは、各科に含まれる特徴的な代謝産物が異なるためと考えられる。本研究では市販の豆類の結果から広範囲な代謝産物の蓄積様式は各マメ類を分類することが可能であることが分かった。これらは、遺伝子情報および可視の表現系では解明が困難な新規の関係性であり、各豆類で顕著な差が見られた代謝産物は各豆類を分類するマーカーとなると期待される。

また、モデルマメ科植物ミヤコグサのmQTLでは予備的な結果ではあるが、代謝産物を制御するQTLが推定可能であることが分かった。今後、RILの個体数を増やし原因遺伝子を同定すれば他の作物品種に利用可能な重要なQTLが発見できると期待している。

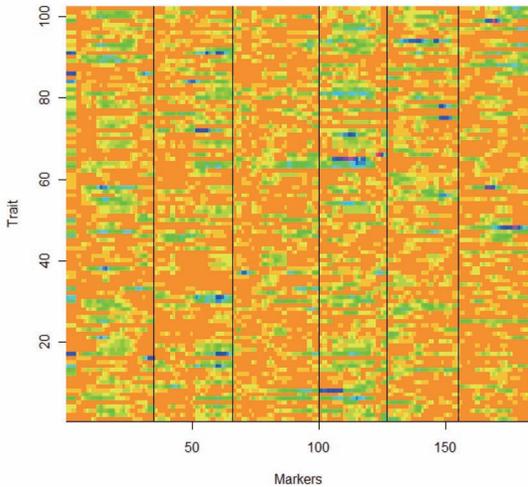


Fig. 4. *Lotus japonicus* RIL QTL analysis with metabolites as phenotypes. The colors represent the LOD score (logarithm of odds), on the x-axis the marker number and on the y-axis the metabolite.

## 要 約

マメ科植物の種子は重要な食料資源であり、その多様な代謝産物は有用形質や農業上の付加価値と直結することから、代謝産物の包括的な解析（メタボロミクス）が注目されている。植物は種子状態で保存可能であるため国内外のバイオリソースセンターから比較的大規模な栽培品種および野生型品種などの種子ストックが入手可能である。しかし、測定対象の物性が多岐にわたるメタボロミクスは標準的な技術は未確立であり、一般研究者が利用可能な共通プラットフォームや公開データが求められている。また、現在主流の非ターゲット検出では膨大な取得データから必要情報を選択する技術が未確立であり、大規模な植物バイオリソースには適用できなかった。そこで、我々は高速分析に適した分離装置（Ultra performance liquid chromatography, UPLC）と高感度な質量分析装置（tandem quadruple mass spectrometer, TQMS）を組み合わせた広範囲化合物分析方法（widely targeted metabolomics）を構築した。これまでに、標準化合物、文献情報、化合物データベース情報を含め測定可能な化合物を700化合物以上に増加した新規メタボロミクス技術を構築した。本研究では、マメ科植物の種子に適用可能な分析プラットフォームを構築し、代表的なマメ科のバイオリソースに適用した。この結果、市販の豆類および実験モデル植物ミヤコグサの種子抽出物から100–200化合物の代謝産物検出に成功した。市販の豆類では代謝産物の蓄積量による階層化クラスターリングおよび主成分解析を行った。さらに、ミヤコグサのmetabolite quantitative trait locus (mQTL) 解析を行った。

## 文 献

- 1) J. Schmutz *et al.* (2010): Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*, **463**, 178-183.
- 2) A. R. Fernie, R. N. Trethewey, A. J. Krotzky and L. Willmitzer (2004): Metabolite profiling: from diagnostics to systems Biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 763-769.
- 3) R. L. Last, A. D. Jones and Y. Shachar-Hill (2007): Towards the plant metabolome and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 167-174.
- 4) M. Y. Hirai *et al.* (2010): Toward genome-wide metabolotyping and elucidation of metabolic system: Metabolic profiling of large-scale bioresources. *J Plant Res*, **123**, 291-298.
- 5) Y. Sawada *et al.* (2009): Widely Targeted Metabolomics based on large-scale Ms/Ms data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant Cell Physiol*, **50**, 37-47.
- 6) Y. Sawada *et al.* (2009): Omics-based approaches to methionine side chain elongation in Arabidopsis: Characterization of the genes encoding methylthioalkylmalate isomerase and methylthioalkylmalate dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1181-1190.
- 7) Y. Sawada *et al.* (2009): Arabidopsis bile acid:sodium symporter family protein 5 Is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1579-1586.
- 8) F. Matsuda *et al.* (2010): Atmetexpress development: A phytochemical atlas of Arabidopsis development. *Plant Physiol*, **152**, 566-578.
- 9) F. Matsuda *et al.* (2009): Ms/Ms spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *Plant J*, **57**, 555-577.
- 10) M. Y. Hirai *et al.* (2007): Omics-based identification of Arabidopsis Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 6478-6483.
- 11) Y. Okazaki *et al.* (2009): A chloroplastic UDP-glucose pyrophosphorylase from Arabidopsis is the committed enzyme for the first step of sulfolipid biosynthesis. *Plant Cell*, **21**, 892-909.
- 12) V. T. Chu, R. Gottardo, A. E. Raftery, R. E. Bumgarner and K. Y. Yeung (2008): MeV+R: using MeV as a graphical user interface for bioconductor applications in microarray analysis. *Genome Biol*, **9**, R118.
- 13) K. Tamura, J. Dudley, M. Nei and S. Kumar (2007): MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, **24**, 1596-1599.
- 14) K. W. Broman, H. Wu, S. Sen and G. A. Churchill (2003): R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, **19**, 889-890.