

ダイズ近縁種ツルマメのメタボローム情報を利用した代謝育種研究

澤田有司^{*1,2}

¹独立行政法人理化学研究所植物科学研究センター

²独立行政法人理化学研究所環境資源科学研究センター

Metabolic Breeding Research Using Metabolome Data of *Glycine Soja*

Yuji SAWADA^{*1,2}

¹RIKEN Plant Science Center, Yokohama 230-0045

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science, Yokohama 230-0045

ABSTRACT

Metabolomics is a methodology for comprehensive detection and quantification of all detectable metabolites in an organism. We have established a high throughput metabolomics platform, which we have named "widely targeted metabolomics". Using this methodology, we can detect several hundred standard compounds by high sensitivity detection mode: selected reaction monitoring (SRM) of a tandem quadrupole mass spectrometer. We have also established a novel algorithm, which can be managed for several thousand SRM conditions. This algorithm allowed us to detect an un-targeted tandem mass spectrum (MS/MS) as an integrated SRM (iSRM). Moreover, we have established a MS/MS database for assignment of candidate structures (<http://spectra.psc.riken.jp/>). In a previous study, we carried out the SRM and iSRM assay for soybean seed, and the metabolite quantitative trait locus (mQTL) analysis successfully identified by mapping populations which have been constructed from *Glycine max* and *Glycine soja* (National BioResource Project). In this study, we try to identify the specific metabolite accumulation patterns in seeds. The *G. max* and *G. soja* seeds were separated into cotyledon and seed coat, and the tissues were used for metabolic profiling. Principal component analysis (PCA) was conducted using the metabolome data. Using score plot, the Principal component 1 was clearly separated from the cotyledon and seed coat samples. To elucidate important metabolites, we carried out regression analysis: Partial least squares (PLS). The results suggested that sugar, nucleotide, and malonyl isoflavone were major components in cotyledon. The anthocyanin pigment and non-proteogenic amino acid were accumulated in the seed coat. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 30-34, 2013.

*〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-22

Key words : Metabolomics, seed coat, cotyledon, *G. max*, *G. soja*., multivariate analysis

ダイズは日本人が毎日食べている食材であり、その機能を高める品種改良は日本農業の重要な課題である。我々は高機能性ダイズの開発を目指し、メタボローム解析技術の確立と同技術を利用した量的形質座解析を行っている。このメタボローム解析は広範囲な代謝産物を対象として蓄積情報を得られる^{1, 2)}。これらは従来の分析手法では得られなかったダイズ成分育種の基盤情報である。これまでに組み換え自殖系統 (recombinant inbred line, RIL) のメタボローム情報を取得し、分子マーカーとの関連性を計算する連鎖解析を行った³⁾。この結果、栽培種ダイズと野生種ツルマメ間のRILで顕著な量的形質座 (Quantitative trait locus, QTL) が同定できた (Sawada *et al.*, Computational and Structural Biotechnology Journal 2013 in press)。一方、栽培種間のRILを使った連鎖解析では顕著なQTLが発見できなかった。この結果は、野生種ツルマメが代謝育種の遺伝資源として重要であることを示している。

ツルマメとダイズは見た目の表現型 (種子の大きさ、種皮の色) も大きく異なることが解っている。従って、ツルマメとダイズから発見されたQTLは代謝産物の局在性に影響されている可能性がある。そこで本研究では、ダイズ、ツルマメ種子を部位別 (種皮、子葉) にサンプリングし、代謝産物量を測定した。この結果、部位特異的に高蓄積する代謝産物が解明できた。

方 法

植物種子材料

種子の器官別分析用のサンプルとしてダイズ、ツルマメ、組み換え自殖系統 (recombinant inbred line, RIL) を北海道大学の山田哲也博士から提供いただいた。

分析試料の作成方法

ダイズ、ツルマメ、RILの種子は、種皮と子葉に分けてビーズショッカーで粉末化した。この試料を2 mg 秤量し、5 mmジルコニアビーズを1個と500 μ Lの抽出溶媒 (80% MeOH) を加え再度ビーズショッカー処理し、抽出液を調製した。

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10倍希釈し、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 μ LのH₂Oで再溶解後、384 well filter plate (Watman社) でフィルター濾過した。

サンプルの分析

抽出サンプルは、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析装置で分析した (Waters社UPLC-TQS)。代謝産物の分離条件と検出条件は既報の方法で行った⁴⁻⁶⁾。検出対象は540種の高感度検出条件 (Selected reaction monitoring, SRM) を用いた。

データ解析

各サンプルの分析結果から得られたメタボローム情報 (540種のSRMをLC-MS/MS分析で検出した各ピーク面積) を独立の変数として統計ソフト (R, <http://www.r-project.org/>) で解析した。ノーマライズ (Log2変換した後、Z-score化) した各Area値を統計解析と多変量解析 (principal component analysis, PCA; Partial Least Squares, PLS) に利用した。

結 果

ワイドターゲットデータの取得と統計解析

本研究ではダイズ、ツルマメ、RIL (ダイズとツルマメの交配系統) から種皮、子葉を調製し、粉末化した後に各サンプルを秤量した。このサンプルのメタボロームデータをLC-MS/MS分析によって取得し、特徴的な蓄積様式を示す代謝産物を探索した。まず検出対象とした540種のSRM条件から検出強度がノイズレベルの10倍以上 ($S/N \geq 10$) の187種のSRMを選択し、以降の解析に利用した。次に各代謝産物の蓄積量を変数とし、種皮と子葉を比較するt検定 (Welch法) と fold change (子葉サンプルの平均値/種皮サンプルの平均値) を算出した。この単変数を対象とした統計解析では43種SRMが顕著な差が見られた ($|\text{Fold change}| > 5$, ボンフェローニ補正した有意水準)。このうち31種の代謝産物は子葉に特徴的に蓄積していることが解った (Fig. 1)。

主成分分析による全体像の確認

統計解析ではメタボローム情報の全体像をとらえることは困難である。そこで最もサンプル間の差に寄与する変数 (主成分) を探索的に調べる主成分解析を行った。この結果、187種の変数から算出された第一主成分と第二主成分で種皮と子葉のサインプルが明確に分離できることが解った (Fig. 2A)。また、第三主

成分までの積算寄与率が60%以上であることが解った (Fig. 2B).

PLSによる種皮と子葉に特徴的な代謝産物の推定

PLSはオミックス解析で利用される判別分析で多変量データを利用したバイオマーカー探索が可能であ

る. 本研究では種皮と子葉に特徴的な代謝産物を予測した (Fig. 3). この結果, 子葉にはマロニル化イソフラボン, オリゴ糖, 核酸, アミノ酸が顕著に蓄積していることが推定された.

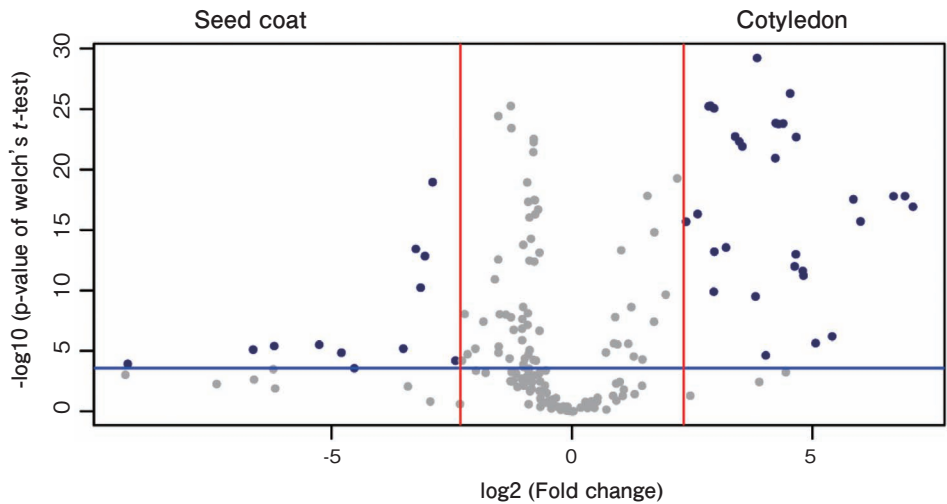


Fig. 1. Volcano plot of widely targeted metabolomics data. Blue line shows threshold of p-value using Bonferroni adjustment. Red lines shows threshold of fold change ($|\text{Fold change}| = 5$). The significant metabolites shown as closed circle of navy color.

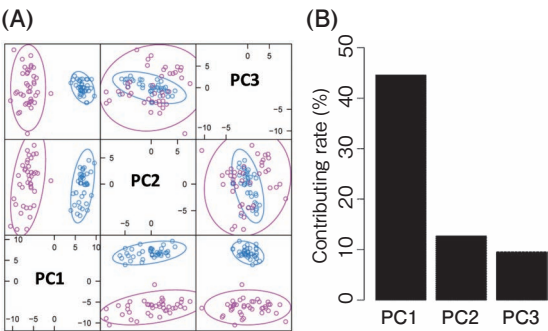


Fig. 2. Multiple score plots of principal component analysis. (A) The samples of cotyledon (pink) and seed coat (light blue) were plotted by the score for principal component 1-3 (PC 1-3). (B) Contributing rates of PC 1-3 shown by barplot.

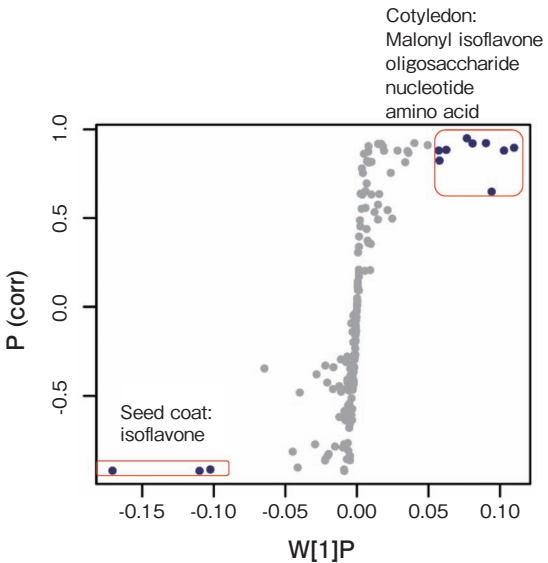


Fig. 3. Partial least squares analysis. Using optimal algorithm (OPLS DA) for predictive modeling, the significant metabolites shown at upper right and left bottom left corners (closed circles of navy color). Thresholds: $|W[1]P| > 0.05$, $|P(\text{corr})| > 0.5$.

考 察

前年度の報告したダイズ種子のメタボローム解析では、木槌で予備破碎した種子全体を粉末した試料を調製していた。この結果からmQTLの同定に成功したが、この方法では各代謝産物の局在性は未解明であった。そこで本研究では種皮、子葉を予め分離し、メタボローム解析を行った。この結果、各部位に特徴的に蓄積する代謝産物が多数検出できた。子葉には生存に必須な一次代謝産物が特徴的に含まれており、これらは発芽時に必要不可欠な代謝産物であると考えられる。一方、種皮には非たん白性アミノ酸や種皮色に関わるフラボノイド色素が検出された。これらは一次代謝産物から生合成される二次代謝産物であり、環境適応に必須の鍵代謝産物である。代謝の全体像を示す多変量解析では種皮と子葉のサンプルが明確に分離される一方、ダイズ、ツルマメ、RILなどの違いは第二主成分として検出される。この結果から種皮と子葉の違いが代謝の全体像に極めて重要であることが予測される。同様の結果は判別分析でも示され、一次代謝産物が子葉に蓄積することが重要であることが推定された。

今後は国内外のバイオリソースセンターから入手可能なダイズコアコレクションを利用し、種子のメタボローム解析を行う予定である。これらは、予め種皮、子葉、胚軸に分離し、ダイズ代謝産物の詳細な蓄

積様式を解明する。これらの情報は従来の種子全体を対象としたメタボローム解析では得られない代謝育種の基盤情報であり、部位特異的な生合成や蓄積に関わるダイズ種子の代謝システムに興味を持たれる。今後、広範囲な代謝産物の部位特異的な蓄積様式に関わるmQTLが同定されれば、ダイズ種子の加工特性に適した効率的な代謝制御が可能になると期待される。また、ダイズ、ツルマメで解明されつつある高密度な一塩基多型情報とこれらの代謝産物の局在性情報を利用すれば、より広範囲な遺伝資源の多型情報に基づく代謝育種が実現できる。これらの研究成果は理研のHP (<http://prime.psc.riken.jp/>) から公開し、基礎から応用まで幅広い分野で利用可能である。本研究で公開した基盤情報がダイズ代謝育種の発展につながることを期待している。

謝 辞

本研究で利用したダイズ、ツルマメ、RILは北海道大学大学院農学研究院の山田哲也博士から提供いただいた。メタボローム情報の取得では理化学研究所植物科学研究センター（2013年4月から環境資源科学研究センター）の技術員である坂田あかね（サンプル抽出）、佐藤心郎（LC-MS/MS分析）、山田豊（情報処理）の支援を得た。本研究にご協力いただいた皆様に感謝いたします。

要 約

申請者は世界に先駆けて高速、高感度、広範囲分析が可能なメタボロミクス技術確立した。さらに数百～数千の標的代謝産物に適用可能な分析マネジメントアルゴリズムの開発に成功している（日本、米国の特許出願中）。同技術でマメ科代謝産物の広範囲分析および検出情報の構造推定が可能なMS/MSデータベースの公開に成功している。この結果、これまで未利用の遺伝資源を対象とした大規模な代謝産物量の計測が実現できた。本研究はこの独自技術をダイズの代謝育種研究に利用した。これまでにダイズの栽培種と日本に自生するツルマメの組み換え自殖系統（recombinant inbred line, RIL）の種子を利用したメタボロームquantitative trait locus (mQTL) 解析を行った。このmQTL解析では異なる表現型を示す2種の親株からRILを作成し、表現型（各代謝産物の蓄積量）と関連する遺伝子多型マーカーを同定する連鎖解析を行った。この結果、ツルマメに高蓄積するフラボノイドと糖など17種の代謝産物に顕著な関連性を示す4箇所のmQTLが同定された。QTL解析で発見したフラボノイドは種皮成分として知見がある。そこで、ダイズ、ツルマメ種子を部位別（種皮、子葉）にサンプリングし、代謝産物量を測定した。この結果、部位時的に高蓄積する代謝産物が解明できた。これらの研究成果は理研のHP (<http://prime.psc.riken.jp/>) から公開予定である。

文 献

- 1) Sakurai T, Yamada Y, Sawada Y, Matsuda F, Akiyama K, Shinozaki K, Hirai MY and Saito K (2013): PRIME Update: innovative content for plant metabolomics and integration of gene expression and metabolite accumulation. *Plant Cell Physiol*, **54**, e5.
- 2) Nakabayashi R, Sawada Y, Yamada Y, Suzuki M, Hirai MY, Sakurai T and Saito K (2013): Combination of Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry with C-13-Labeling for Chemical Assignment of Sulfur-Containing Metabolites in Onion Bulbs. *Anal Chem*, **85**, 1310-1315.
- 3) Sawada Y, Nakabayashi R, Yamada Y, Suzuki M, Sato M, Sakata A, Akiyama K, Sakurai T, Matsuda F, Aoki T, Hirai MY and Saito K (2012): RIKEN tandem mass spectral database (ReSpect) for phytochemicals: a plant-specific MS/MS-based data resource and database. *Phytochemistry*, **82**, 38-45.
- 4) Sawada Y, Akiyama K, Sakata A, Kuwahara A, Otsuki H, Sakurai T, Saito K and Hirai MY (2009): Widely targeted metabolomics based on large-scale MS/MS data for elucidating metabolite accumulation patterns in plants. *Plant Cell Physiol*, **50**, 37-47.
- 5) Sawada Y, Kuwahara A, Nagano M, Narisawa T, Sakata A, Saito K and Hirai MY (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.
- 6) Sawada Y, Toyooka K, Kuwahara A, Sakata A, Nagano M, Saito K and Hirai MY (2009): Arabidopsis bile acid:sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1579-1586.