



質量分析装置を用いた植物代謝産物変動解析手法の開発と植物環境応答機構研究

姉川, 彩

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2015-03-06

(Date of Publication)

2016-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3269号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003269>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 姉川 彩

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

質量分析装置を用いた植物代謝産物変動解析手法の開発と植物環境応答機構研究

植物は、動物と比較して、光合成や二次代謝などにより複雑な代謝系を持つことが良く知られている。近年、発展してきた生体内の代謝産物を同時分析し網羅的な解析を行う「メタボローム解析」は、この代謝系の機能解析に重要な手段と考えられている。一方で、植物種やそれらの細胞や組織によっても含まれる代謝産物の種類や濃度が異なり、その絶対量も pmol-mmol (Dunn and Ellis. 2005) と幅広いことから、分析手法の一般化や解析手法の開発は遅れていた。植物体内には、動物に比べ分析対象となる代謝物質がはるかに多く (ヒトの代謝物質は約 3,000 種)、シロイヌナズナで 5,000 種、植物界全体では合計約 200,000 種の代謝物質が存在すると言われており、それらの代謝物が複雑に関連しているため、抽出や分析に一般的なメタボロミクス手法を応用することが難しいことが要因にあげられる。

本研究では、種々の質量分析装置を用いたメタボローム解析を植物に応用し、新たな生理現象の解明を目指した。未だ一般化されていない質量分析装置を用いた植物メタボロームの技術の確立から始め、これらの技術開発やその応用、さらには植物細胞の新しい代謝像の一旦を明らかにすることを目標に掲げたものである。

第1章では、比較的新しいメタボローム解析の分析技術として注目され、未だ発展途上の技術であるキャピラリー電気泳動-質量分析装置 (Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry; CE-MS) を植物分野に用いるための解析手法の確立を目指した。CE-MS に用いる泳動バッファの種類、pH の検討を行った。その結果、陽イオン性化合物は 27 種類、植物ホルモンを含む陰イオン性化合物は 77 種類を、一斉分析できる手法を確立することに成功した。

第2章では、この標準物質を用いた定量分析によるターゲット解析により、植物細胞(液胞)内代謝産物の測定を行った。液胞内にはリジン、アルギニン、リンゴ酸、クエン酸が多く検出され、過去の知見と一致する結果となった。さらに、比較的高濃度のリン酸化合物が液胞内に存在することを初めて見出した。

第3章では、検出される全ピークを解析対象とし質量電荷比 (m/z) から得られる組成式などの精密質量データを用いた半定量・定性分析 (ノンターゲット解析) を行った。このノンターゲット解析では、CE-MS よりもさらに高分解能を持つフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析装置 (Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; FT-ICR-MS) を用い、検出される全ピークの m/z 値から組成式を作成し、シユート、根、細胞、液胞、それぞれに含まれる代謝物質の化合物候補の同定を試みた。標準物質では同定できない未知ピークの解析から、細胞と液胞に共通に存在する分子が 429 個見出され、代謝産物データベース KNApSAcK 検索によるアノテーションの結果、1 割近くを同定することができた。

姉川 彩 : NO.2

第4章では、シロイヌナズナ植物体を用いて、植物の生活環ほぼすべてにおいて重要な働きをする植物ホルモンの1つであるオーキシニンに応答する代謝変動解析を行った。シロイヌナズナの野生型とオーキシニン応答変異体 (*tir1, slr, arf7 arf19*) に対し、第1章で確立した CE-MS によるターゲット解析を応用することで、外部から与えたオーキシニンに反応して変動する代謝物質変動の比較解析を行った。野生型の根およびシュートで変動を示す代謝産物が複数確認された。IAA 処理による代謝変動は野生型の根で顕著に見られ、アミノ酸やリン酸化化合物の変動が大きいことが分かった。野生型に比べ、3つのオーキシニン非応答性変異体のシュートおよび根で変動する一次代謝産物は少なく、その変動も小さかった。野生型植物の根で見られた変動は、過去の知見と呼吸測定の結果から、呼吸阻害によって引き起こされた代謝変動であることが示唆された。

第5章では、形態を保ったまま測定できる質量顕微鏡 (イメージングマスマスペクトロメトリー) の技術を用いて、シロイヌナズナの根でオーキシニンに反応して生体内で変動する分子、あるいは生体内分布の変動する分子の探索を行った。このノンターゲット解析では、根端にのみ局在を示す分子、オーキシニン処理によって局在を変える分子など様々なシグナルパターンを見ることができた。また、KNAPSAcK 検索のアノテーションの結果、20-30% の化合物を同定することができた。

質量分析装置を用いた植物メタボローム解析手法の確立によって、これまで個々に見ていた代謝産物の一斉分析が可能となり代謝を俯瞰的に見ることが可能となった。また、分解能の高い質量分析を用いることによって精度の高い組成式候補結果が得られ、未知化合物の発見にもつながる可能性がある。本研究では、これらの技術の開発や応用によって植物細胞の新しい代謝像の一旦を明らかにすることに成功した。

氏名	姉川 彩		
論文 題目	質量分析装置を用いた植物代謝産物変動解析手法の開発と植物環境応答機構研究		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教 授	三村 徹郎
	副 査	教 授	坂本 博
	副 査	教 授	深城 英弘
	副 査	准教授	宮本 昌明

要 旨

生命の本質を規定する遺伝子の全体像はゲノムとして知られ、近年の分析技術は、モデル生物のみならず多種多様な生物のゲノム構造を明らかにすることが出来るようになってきている。

一方、その遺伝子が発現して、実際の生命活動がどのように営まれているかを明らかにするために、ポストゲノム手法が発展してきた。遺伝子産物である RNA の全体像はトランスクリプトームとして、タンパク質の全体像はプロテオームとして知られるが、近年注目を浴びているのは、代謝産物の全体像を明らかにしようとする「メタボローム解析」である。特に、医学分野では、各種疾病のマーカー探索にメタボローム手法が盛んに用いられている。

本研究が研究対象とした植物は、動物と比較して、光合成や二次代謝などにより複雑な代謝系を持つことが良く知られている。そのため「メタボローム解析」は、動物に比べて困難な点が多いが、一方で、ゲノムやトランスクリプトーム解析のみでは明らかに出来ない代謝系の機能解析に重要な手段と考えられている。

植物の代謝物質の種類や数が多岐にわたることや、それらの濃度が幅広いことから、分析手法の一般化や解析手法の開発は遅れていた。本研究では、まず、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (CE-MS) を中心に、質量分析装置を用いた植物メタボローム解析手法の開発を進め、それを用いて植物細胞オルガネラとして重要な液胞の代謝産物解析を行うことに成功した。さらに、植物生活環全般で重要な働きをしているオーキシニンによる代謝変動をメタボローム解析から明らかにすることにも成功した。

このように、本研究は、植物科学分野ではまだ黎明期にあったメタボローム解析手法を、技術的に利用可能なレベルまであげることに成功するとともに、世界でもほとんど行われていないオルガネラメタボロームを初めて成功させ、さらに植物ホルモンと代謝産物の関係に焦点をあてることに成功した重要な研究である。

本論文は、全5章からなる。

第1章「キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(CE-MS)を用いたメタボローム解析手法の確立」では、植物生体内代謝産物一斉分析手法の開発を目指し、CE-MS に用いる泳動バッファの種類、pH の検討を行った。その結果、陽イオン性化合物は 27 種類、植物ホルモンを含む陰イオン性化合物を 77 種類、一斉分析できる手法を確立することに成功した。

第2章「CE-MS を用いた植物細胞における生体内物質の分布解析」では、第1章で確立したキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置(CE-MS)を用いたメタボローム解析手法による標準物質を用いた定量・ターゲット解析により、植物細胞内代謝産物の測定を行った。実験材料としてシロイヌナズナ培養細胞を用い、培養細胞、プロトプラスト、そこから単離した液胞の代謝物質解析を進めた。液胞内にはリジン、アルギニン、リンゴ酸、クエン酸が多く検出され、過去の知見と一致する結果となった。さらに、比較的高濃度のリン酸化化合物が液胞内に存在することを見出した。プロトプラストやそこからの液胞単離

氏名	姉川 彩
<p>過程は、かなり時間がかかることから、その間に物質分布にも変化が生じることを明らかにした。</p> <p>第3章「FT-ICR-MS を用いた植物体及び植物細胞における生体内物質の分布解析」では、高分解能の FT-ICR-MS を使い、植物体および植物細胞のノンターゲット解析も進めた。標準物質では同定できない未知ピークの解析から、細胞と液胞に共通に存在する分子が 429 種見出され、代謝産物データベース KNApSACk 検索によるアノテーションの結果、1割近く化合物候補を見出すことができた。</p> <p>第4章「シロイヌナズナ植物体のオーキシシン添加にตอบสนองする代謝変動解析」では、これまでに確立したターゲット・ノンターゲット解析手法を応用し、シロイヌナズナ植物体を用いてオーキシシンにตอบสนองする代謝変動解析を行った。野生型植物で、オーキシシン処理によってアミノ酸、有機酸、リン酸化合物が変動した。過去の知見と呼吸測定の結果から、呼吸阻害によって引き起こされた代謝変動であることが示唆された。シロイヌナズナ野生型に加えて、オーキシシン応答に関与する因子、<i>tir1</i> (オーキシシン受容体)、<i>slr</i> (転写調節因子)、<i>arf7/arf19</i> (転写因子) 三種類の変異体のオーキシシン処理に伴う代謝変動を調べたが、野生型に比べると変動は少なかった。</p> <p>第5章「質量顕微鏡 (イメージングマスマスベクトロメトリー) を用いた外因性オーキシシン処理にตอบสนองする根の代謝物質分布解析」では、代謝物質の組織局在とそのオーキシシンによる変動を調べた。質量顕微鏡によるノンターゲット解析では、根端にのみ局在を示す分子、オーキシシン処理によって局在を変える分子など様々なシグナルパターンを見いだすことができた。また、KNApSACk 検索のアノテーションの結果、20-30% の化合物を同定することができた。</p> <p>以上、質量分析装置を用いた植物メタボローム解析手法の確立によって、これまで個々に見ていた代謝産物の一斉分析が可能となり代謝を俯瞰的に見ることが可能となった。また、分解能の高い質量分析を用いることによって精度の高い組成式候補結果が得られた。本研究では、これらの技術の開発や応用によって植物細胞の新しい代謝像の一端を明らかにすることに成功した。以上の、確立された測定技術、測定された代謝産物の分布とその変動は、植物を対象としたメタボローム解析において価値あるデータの集積であると認める。よって、学位申請者の姉川彩は、博士 (理学) の学位を得る資格があると認める。</p> <p>・特記事項 ・特許登録数 0 件 ・発表論文数 9 編 (学位論文用論文 1編 (欧文)、その他 8編 (欧文6編、和文2編))</p>	