

共発現解析による二次代謝関連遺伝子の機能同定

平井 優美

理化学研究所 植物科学研究センター 代謝システム解析チーム
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Functional identification of secondary metabolism-related genes by coexpression analysis

Keywords: coexpression analysis; functional genomics;
metabolomics; secondary metabolite; transcriptomics.

Masami Yokota Hirai

Metabolic Systems Research Team, RIKEN Plant Science Center
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

1. はじめに

日本ではまだまだ高額な実験であるものの、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析へのハードルが低くなって久しい。公開データベースに登録されたマイクロアレイデータの利用については費用がかからないため、すべての研究者に扉が開かれている。マイクロアレイデータベースの情報を利用した二次データベース、ウェブツールはいまや数多く存在し、これらを利用して遺伝子機能を予測することは、最近では一般的な方法論となってきた。一方、トランスクリプトーム解析技術に遅れて始まったメタボローム解析技術の開発も、最近では一段落して、代謝のみならずさまざまな現象への興味から「メタボローム分析をしてみよう」と思う研究者が増えてきたようである。筆者はここ 10 年ほど、トランスクリプトーム、メタボローム解析を使った代謝研究を行っているが、トランスクリプトームとメタボロームデータの統合解析という方法論は、二次代謝に関わる遺伝子の機能同定において非常に力を発揮すると感じている。本稿では、筆者の研究を例として、トランスクリプトミクスとメタボロミクス/ターゲット代謝プロファイリングによる二次代謝の遺伝子機能同定を紹介する。

2. 二次代謝の転写レベル制御

代謝は細胞内外の環境変動に応じて調節されている。例えば、土壌中の必須栄養元素が乏しい環境では、その元素を吸収・同化する機能が向上するように遺伝子発現が変化する。別の例では、特定のアミノ酸の細胞内濃度が上昇すると、そのアミノ酸による自身の生合成経路のフィードバック抑制が多くの場合は酵素活性レベルでかかり、他のアミノ酸との量的バランスが保たれる。このアミノ酸量の調節に代表されるように、一次代謝においては代謝の恒常性が保たれるような制御が重要であると考えられる。環境変動のわずかな変化にตอบสนองして代謝を微調整するために、タンパク質レベル、酵素活性レベルでの制御が重要である。これに対し、強光ストレス下でのアントシアニン蓄積のように、特定の環境下での生理機能を担う二次代謝産物の蓄積には、その生合成経路全体を一斉に促進・抑制するような制御の仕組みが適していると考えられる。少数の転

写制御因子によって、生合成に関与する酵素群や輸送体をコードする遺伝子の発現を一括制御して、代謝産物量をダイナミックに変化させるメカニズムが考えられる。アントシアニン、グルコシノレート、アルカロイドの生合成経路の制御などにその例が見られる(Beekwilder et al. 2008, Gigolashvili et al. 2007a,b, Hirai et al. 2007, Malitsky et al. 2008, Sønderby et al. 2007, 2010, Tohge et al. 2005, van der Fits&Memelink 2000, Zhang et al. 2011 ほか)。

トランスクリプトーム、メタボローム解析に関する筆者の経験では、一次代謝産物の蓄積量の変動は、関連する遺伝子の転写産物 (mRNA) の蓄積量の変動では説明できない例が多く、逆に二次代謝産物ではよく説明できた(Hirai et al. 2004)。これは上述の制御メカニズムの違いによると考えられる。

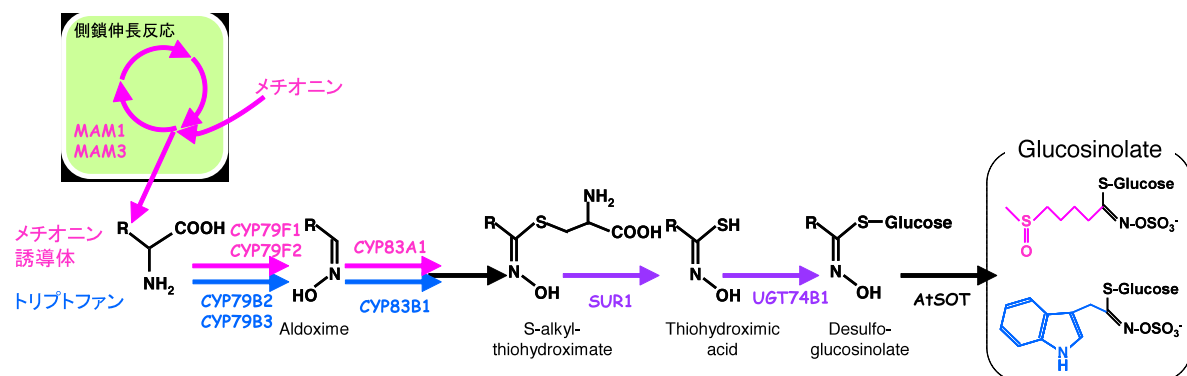
3. 二次代謝に関わる遺伝子の同定

3-1. 個別研究による機能同定—シロイヌナズナのおミクス解析

筆者らは、硫黄栄養 (土壌や培地中の硫酸イオン) 欠乏に対する植物の応答反応を解明する目的で、硫黄欠乏ストレス下のシロイヌナズナの経時的なトランスクリプトーム解析とメタボローム解析を行った(Hirai et al. 2003, Hirai et al. 2005)。このとき、一次代謝である硫黄同化経路やアミノ酸生合成経路などの各酵素遺伝子は、統一的に説明できる発現変化を示さなかったが、二次代謝であるアントシアニン生合成経路の酵素遺伝子群やグルコシノレート生合成経路の酵素遺伝子群は、それぞれ同調的に発現が変化していた。逆に、同調的に発現する遺伝子群、つまり「共発現」する遺伝子群は、同じ生理機能に関与する可能性が高いと予測できる。この実験では、既知のグルコシノレート生合成遺伝子群と共発現する putative sulfotransferase とアノテーションが付いた遺伝子が3つあった。シロイヌナズナゲノム中には putative sulfotransferase 遺伝子が18個あり、アミノ酸配列を元に系統樹を書くと、上記の3つ (*AtSOT16, 17, 18*) が1つのクレードをなしており、共通の基質に対する反応が予想された。一方、グルコシノレートの生合成経路はほぼ明らかになっており、いくつかの酵素遺伝子は同定されていた (図1のピンク、青、紫字で書かれた遺伝子) が、硫酸転移反応に関わる遺伝子は未同定であった (図1)。これらの結果から、上記の3遺伝子はいずれもグルコシノレート生合成の硫酸転移酵素をコードしていると予測した。定法

図1 グルコシノレートの生合成経路

グルコシノレートは主にアブラナ科の植物に見られる二次代謝産物であり、アミノ酸を前駆体として作られる。シロイヌナズナのアクセッション *Columbia* では、主にメチオニンとトリプトファンが前駆体となる。側鎖 (構造式のピンクと青の部分) はいろいろな修飾を受けて、多数の分子種が存在する。



に従って AtSOT16, 17, 18 の組換えタンパク質を作成し, *in vitro* の酵素活性測定を行った結果, 3 つとも予想された基質に硫酸基を付加する活性を持っており, 予測遺伝子機能が正しいことが示された(Hirai et al. 2005)。また, この他に複数のグルコシノレート生合成関連遺伝子の候補が予測できた。この研究から, 転写産物の網羅的解析によって共発現する遺伝子を見つけ, その配列情報と生合成経路の情報を利用して機能を推定する, という戦略が特に二次代謝に関わる機能ゲノミクスにおいて非常に有効であることが分かった。

3-2. 個別研究による機能同定—非モデル植物

上記は, 全ゲノムが解読されたシロイヌナズナのマイクロアレイ解析と, そのデータを用いた共発現解析によって, 二次代謝 (グルコシノレート) 生合成に関わる遺伝子群を予測・同定した例である。研究の当初の目的がグルコシノレート関連遺伝子の同定にあったわけではなく, ある意味で研究の副産物として遺伝子機能予測ができた, という点でも「オミクスの」な仕事であり, 「データから仮説を構築」した (= 遺伝子機能を予測した) ということになる。次章で述べるが, 「遺伝子共発現解析」は後に, シロイヌナズナの遺伝子機能を予測する一般的なツールとなった (Aoki et al. 2007, Saito et al. 2008)。だが, いわゆる「オミクス以前」にも, 広義の遺伝子共発現解析, 代謝産物と遺伝子との共起解析によって, 二次代謝関連の遺伝子が多数単離されている。

アルカロイドなどの生合成では, ジャスモン酸類や他のエリシターによって誘導される例が多く知られている。そこで生合成遺伝子の単離を目的として, ジャスモン酸類などによる誘導条件と非誘導条件とで植物 (培養細胞) から転写産物を抽出し, ディファレンシャルディスプレイ, cDNA サブトラクション, cDNA-RFLP, マイクロアレイなどの方法により誘導条件下で特異的に発現している遺伝子 (cDNA) を網羅的に単離するという研究が行われている。これにより, ベンジルイソキノリンアルカロイド (ケシ, エリシター処理) (Zulak et al. 2007), テルペノイドインドールアルカロイド (ニチニチソウ, メチルジャスモン酸処理) (Rischer et al. 2006), タキソール (イチイ, メチルジャスモン酸処理) (Jennewein et al. 2001, 2004, Schoendorf et al. 2001), キュウリの揮発性成分 (ハダニなどのストレス) (Mercke et al. 2004), ニコチンなど (タバコ BY-2, メチルジャスモン酸処理) (Goossens et al. 2003, Morita et al. 2009), フラボノイド (タルウマゴヤシ, メチルジャスモン酸処理など) (Farag et al. 2009), トリテルペン (タルウマゴヤシ, メチルジャスモン酸処理など) (Achnine et al. 2005, Naoumkina et al. 2010), イソフラボノイド (ダイズ, エリシター処理) (Latunde-Dada et al. 2001, Schopfer&Ebel 1998, Schopfer et al. 1998)などの生合成遺伝子が予測, 単離された。これらは, 共発現関係の抽出に, 遺伝子発現の環境応答を利用した例であるといえる。

一方, 植物間の遺伝子型の違いを利用した研究例もある。同種の植物であるが特定の二次代謝産物の蓄積パターンが異なる成分変種や, 同属の植物で代謝産物のプロファイルの異なる種などを材料に用いて, 興味のある代謝産物を含む方の植物でのみ発現している遺伝子を単離する方法である。上記と同様に, ディファレンシャルディスプレイ, cDNA サブトラクション, cDNA-RFLP, マイクロアレイなどの方法を用いて, 蓄積量に差のある転写産物を一括して解析する。こうした研究で, アントシアニン (シソの成分変種間) (Yamazaki&Saito 2011), バラの香り成分 (品種間) (Guterman et al. 2002), トマトの香り成分 (イントログレッション系統) (Tieman et al. 2006), メチ

ルケトン（トマトのアクセッション，種間雑種）(Ben-Israel et al. 2009, Fridman et al. 2005)，フラボン（ガーベラの品種間）(Martens&Forkmann 1999)，モルヒネ（ケシ属の種間）(Gesell et al. 2009, Ziegler et al. 2006)の生合成遺伝子などが見つかった。

また，発生段階に従った遺伝子発現の変化も共発現関係を見つけるのに利用できる。マイクロアレイを用いた，イチゴ果実の成熟における遺伝子発現変化のパターンから，香り成分の生合成に関わる酵素遺伝子が単離された(Aharoni et al. 2000)。

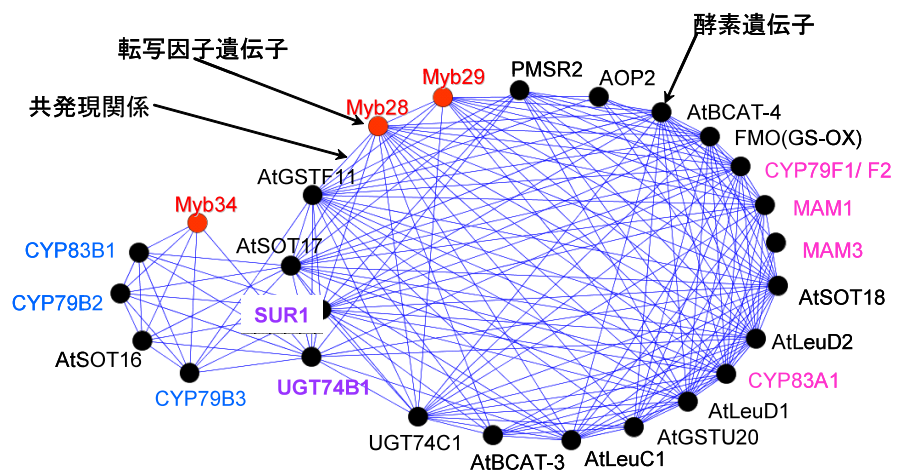
いずれの場合でも，メタボローム解析や特定の二次代謝産物にターゲットした分析によって得られる代謝産物プロファイル，遺伝子発現プロファイルと詳細に対比させることにより，二次代謝産物の基本炭素骨格を作る遺伝子，側鎖修飾に関わる遺伝子などを見つけることができる。

3-3. 公開マイクロアレイデータを利用した機能同定

シロイヌナズナにおいては2000年代前半に，国際コンソーシアムによって組織的にマイクロアレイデータが収集，公開された(Craigon et al. 2004, Goda et al. 2008, Kilian et al. 2007, Schmid et al. 2005)。これは，どの遺伝子が，いつ，どの器官で，どういう条件で発現するかをカタログ化しておこうという試みであった。約22,000遺伝子についての，1,000枚を超えるマイクロアレイ解析で得られる情報は膨大であるため，結果を視覚化したり，検索を容易にしたりするためのウェブツールや二次データベースが多数開発された。筆者がよく用いる ATTED-II (<http://atted.jp/>) (Obayashi&Kinoshita 2010)は，国際コンソーシアムで得られた AtGenExpress expression atlas のデータを基に，遺伝子共発現解析を容易に行えるようにした優れたデータベースである。任意の2遺伝子間の発現パターンの類似度を，ピアソンの相関係数を用いて表しており，発現パターンが全く同じならば1，無関係ならば0となる。適当な閾値を決め，その値より大きな値を示す遺伝子ペアを「共発現している」とする^(註)。章3-1で述べたとおり，筆者らは，硫黄欠乏条件のマイクロアレイデータを用いた共発現解析によってグルコシノレート生合成遺伝子を推定していたが，のちに公開された ATTED-II を用いて共発現解析をすると，候補遺伝子がより絞り込まれる上に，より詳細な機能推定が可能であることがわかった。図2にその解析例を示す。これは，ATTED-IIで絞り込んだグルコシノレート生合成の候補遺伝子と既知遺伝子をピックアップして，相関係数が0.6以上の遺伝子ペアを線で結んだものである。このようにして共発現の関係を視覚化したものを共発現ネットワークと呼んでいる。この図を見ると，メチオニンを前駆体とする生合成酵素

図2 遺伝子共発現ネットワーク

筆者らが研究を開始した当時に既知だった酵素遺伝子をピンク（メチオニンを前駆体とするもの），青（同トリプトファン），紫（同両方）で示しており，図1と対応している。赤字は転写因子遺伝子。



遺伝子と、トリプトファン^(註)のそれとは異なるグループを形成しており、また両方の生合成に関わる酵素遺伝子はその中間に位置していることがわかる。これにより、硫黄欠乏のマイクロアレイデータを使った共発現解析では「グルコシノレートの生合成に關与する」としか予測できなかった遺伝子が、「メチオニン系のグルコシノレートの生合成に關与する」というように、より詳しく機能予測できた。この図では3つの転写因子遺伝子を示したが、そのうちの *Myb34* はトリプトファン系のグルコシノレート生合成酵素遺伝子 *CYP79B2*, *CYP79B3*, *CYP83B1* を正に制御することが知られていた。これらのことから、*Myb28*, *Myb29* 遺伝子はメチオニン系の酵素遺伝子群を正に制御する転写因子であると推定した。これらの遺伝子のノックアウト変異体や過剰発現体を用いた実験から、両遺伝子は予測どおりメチオニン系のグルコシノレート生合成を制御する転写因子であることが示された(Hirai et al. 2007)。また、図2に黒字で示した酵素遺伝子の多くについても、筆者ら(Sawada et al. 2009a)や他の研究グループによってグルコシノレート生合成に關与することが証明されている。

さらに、図2には示さなかったが、グルコシノレート生合成に關与するトランスポーター遺伝子も同様の共発現解析で見つけることができた。メチオニン系の生合成遺伝子と共発現する機能未知遺伝子の中に、動物の胆汁酸トランスポーターに配列の類似した遺伝子 *BASS5* があつた。一方、図1に示したメチオニンの側鎖伸長反応は葉緑体で、グルコシノレートの基本骨格を作る反応は細胞質で起こることから、筆者らは、*BASS5* はグルコシノレート生合成中間体の輸送に關わる葉緑体膜上のトランスポーターをコードすると予測した。直接の輸送活性は示されていないものの、この予測機能もほぼ証明されている(Gigolashvili et al. 2009, Sawada et al. 2009b)。

グルコシノレートやフラボノイドには側鎖の修飾の異なるさまざまな分子種が存在し、葉、根、種子などで異なる分布を示す。器官間の二次代謝産物プロファイルの違いと、遺伝子の器官特異的な発現パターンの違いとを照らし合わせたり、候補遺伝子の機能破壊株の二次代謝産物プロファイルを調べたりすることでも、予測遺伝子機能(酵素の基質特異性など)を絞り込むことができる(Yonekura-Sakakibara et al. 2008, Yonekura-Sakakibara et al. 2007)。また、Matsuda et al. (2009)は、AtGenExpress expression atlas の一部である器官別、発生段階ごとのマイクロアレイデータ(Schmid et al. 2005)に対応するメタボロームデータを取得し、代謝産物の器官、発生段階特異的な蓄積を明らかにした(AtMetExpress metabolite accumulation atlas)。AtGenExpress, AtMetExpress のデータの対応によって、*in silico* で代謝に關わる遺伝子機能予測が可能となった。

^(註)最近の ATTED-II では、ピアソンの相関係数そのものではなく、改良した指標を用いている。

4. おわりに

本稿では、公開マイクロアレイデータを利用した共発現解析として ATTED-II を使つたシロイヌナズナの例を紹介したが、ATTED-II 以外にも多数のツールがある。また、イネ、ダイズ、ポプラなど、シロイヌナズナ以外の共発現解析ツールも出てきた(Obayashi et al. 2011, Ogata et al. 2010)。自前でトランスクリプトーム解析を行う場合には、マイクロアレイに代わり、日々コストが下がってきている次世代シーケンサーによる解析が増えてくるだろう。こうした技術やツールの進歩により、これまであまり手の付けられていなかった多様な二次代謝産物の生合成の解明が可能に

なってくると思われる。

引用文献

- Achnine, L., Huhman, D.V., Farag, M.A., Sumner, L.W., Blount, J.W. & Dixon, R.A. 2005. Genomics-based selection and functional characterization of triterpene glycosyltransferases from the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J.* 41: 875-887.
- Aharoni, A., Keizer, L.C., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blaas, J., van Houwelingen, A.M., De Vos, R.C., van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., van Tunen, A.J. & O'Connell, A.P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12: 647-662.
- Aoki, K., Ogata, Y. & Shibata, D. 2007. Approaches for extracting practical information from gene co-expression networks in plant biology. *Plant Cell Physiol.* 48: 381-390.
- Beekwilder, J., van Leeuwen, W., van Dam, N.M., Bertossi, M., Grandi, V., Mizzi, L., Soloviev, M., Szabados, L., Molthoff, J.W., Schipper, B., Verbocht, H., de Vos, R.C., Morandini, P., Aarts, M.G. & Bovy, A. 2008. The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on insect herbivory in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 3: e2068.
- Ben-Israel, I., Yu, G., Austin, M.B., Bhuiyan, N., Auldridge, M., Nguyen, T., Schauvinhold, I., Noel, J.P., Pichersky, E. & Fridman, E. 2009. Multiple biochemical and morphological factors underlie the production of methylketones in tomato trichomes. *Plant Physiol.* 151: 1952-1964.
- Craigon, D.J., James, N., Okyere, J., Higgins, J., Jotham, J. & May, S. 2004. NASCArrays: a repository for microarray data generated by NASC's transcriptomics service. *Nucleic Acids Res* 32: D575-577.
- Farag, M.A., Deavours, B.E., de Fatima, A., Naoumkina, M., Dixon, R.A. & Sumner, L.W. 2009. Integrated metabolite and transcript profiling identify a biosynthetic mechanism for hispidol in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol.* 151: 1096-1113.
- Fridman, E., Wang, J., Iijima, Y., Froehlich, J.E., Gang, D.R., Ohlrogge, J. & Pichersky, E. 2005. Metabolic, genomic, and biochemical analyses of glandular trichomes from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the biosynthesis of methylketones. *Plant Cell* 17: 1252-1267.
- Gesell, A., Rolf, M., Ziegler, J., Diaz Chavez, M.L., Huang, F.C. & Kutchan, T.M. 2009. CYP719B1 is salutaridine synthase, the C-C phenol-coupling enzyme of morphine biosynthesis in opium poppy. *J. Biol. Chem.* 284: 24432-24442.
- Gigolashvili, T., Engqvist, M., Yatusевич, R., Muller, C. & Flugge, U.I. 2007a. HAG2/MYB76 and HAG3/MYB29 exert a specific and coordinated control on the regulation of aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 177: 627-642.
- Gigolashvili, T., Yatusевич, R., Berger, B., Muller, C. & Flugge, U.-I. 2007b. The R2R3-MYB transcription factor HAG1/MYB28 is a regulator of methionine-derived glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 51: 247-261.
- Gigolashvili, T., Yatusевич, R., Rollwitz, I., Humphry, M., Gershenzon, J. & Flugge, U.I. 2009. The plastidic bile acid transporter 5 is required for the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 1813-1829.

- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., Kiba, T., Takatsuto, S., Fujioka, S., Asami, T., Nakano, T., Kato, H., Mizuno, T., Sakakibara, H., Yamaguchi, S., Nambara, E., Kamiya, Y., Takahashi, H., Hirai, M.Y., Sakurai, T., Shinozaki, K., Saito, K., Yoshida, S. & Shimada, Y. 2008. The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* 55: 526-542.
- Goossens, A., Häkkinen, S.T., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Biondi, S., De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inzé, D. & Oksman-Caldentey, K.-M. 2003. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 8595-8600.
- Guterman, I., Shalit, M., Menda, N., Piestun, D., Dafny-Yelin, M., Shalev, G., Bar, E., Davydov, O., Ovadis, M., Emanuel, M., Wang, J., Adam, Z., Pichersky, E., Lewinsohn, E., Zamir, D., Vainstein, A. & Weiss, D. 2002. Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* 14: 2325-2338.
- Hirai, M.Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M. & Saito, K. 2003. Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA microarray reveals the role of *O*-acetyl-l-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J.* 33: 651-663.
- Hirai, M.Y., Klein, M., Fujikawa, Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Yamazaki, Y., Kanaya, S., Nakamura, Y., Kitayama, M., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Tokuhisa, J., Reichelt, M., Gershenzon, J., Papenbrock, J. & Saito, K. 2005. Elucidation of gene-to-gene and metabolite-to-gene networks in *Arabidopsis* by integration of metabolomics and transcriptomics. *J. Biol. Chem.* 280: 25590-25595.
- Hirai, M.Y., Sugiyama, K., Sawada, Y., Tohge, T., Obayashi, T., Suzuki, A., Araki, R., Sakurai, N., Suzuki, H., Aoki, K., Goda, H., Nishizawa, O.I., Shibata, D. & Saito, K. 2007. Omics-based identification of *Arabidopsis* Myb transcription factors regulating aliphatic glucosinolate biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 6478-6483.
- Hirai, M.Y., Yano, M., Goodenowe, D.B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., Arita, M., Fujiwara, T. & Saito, K. 2004. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 10205-10210.
- Jennewein, S., Rithner, C.D., Williams, R.M. & Croteau, R.B. 2001. Taxol biosynthesis: taxane 13 alpha-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 13595-13600.
- Jennewein, S., Wildung, M.R., Chau, M., Walker, K. & Croteau, R. 2004. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in Taxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 9149-9154.
- Kilian, J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J. & Harter, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50: 347-363.
- Latunde-Dada, A.O., Cabello-Hurtado, F., Czittrich, N., Didierjean, L., Schopfer, C., Hertkorn, N., Werck-Reichhart, D. & Ebel, J. 2001. Flavonoid 6-hydroxylase from soybean (*Glycine max* L.), a novel

- plant P-450 monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 276: 1688-1695.
- Malitsky, S., Blum, E., Less, H., Venger, I., Elbaz, M., Morin, S., Eshed, Y. & Aharoni, A. 2008. The transcript and metabolite networks affected by the two clades of Arabidopsis glucosinolate biosynthesis regulators. *Plant Physiol.* 148: 2021-2049.
- Martens, S. & Forkmann, G. 1999. Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant J.* 20: 611-618.
- Matsuda, F., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Akiyama, K., Yonekura-Sakakibara, K., Provard, N.J., Sakurai, T., Shimada, Y. & Saito, K. 2009. AtMetExpress development: A phytochemical atlas of *Arabidopsis thaliana* development. *Plant Physiol.* 152: 566-578.
- Mercke, P., Kappers, I.F., Verstappen, F.W., Vorst, O., Dicke, M. & Bouwmeester, H.J. 2004. Combined transcript and metabolite analysis reveals genes involved in spider mite induced volatile formation in cucumber plants. *Plant Physiol.* 135: 2012-2024.
- Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Van Montagu, M.C., Inze, D., Rischer, H., Goossens, A., Oksman-Caldentey, K.M., Moriyama, Y. & Yazaki, K. 2009. Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 2447-2452.
- Naoumkina, M.A., Modolo, L.V., Huhman, D.V., Urbanczyk-Wochniak, E., Tang, Y., Sumner, L.W. & Dixon, R.A. 2010. Genomic and coexpression analyses predict multiple genes involved in triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* 22: 850-866.
- Obayashi, T. & Kinoshita, K. 2010. Coexpression landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways. *J. Plant Res.* 123: 311-319.
- Obayashi, T., Nishida, K., Kasahara, K. & Kinoshita, K. 2011. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol.* 52: 213-219.
- Ogata, Y., Suzuki, H., Sakurai, N. & Shibata, D. 2010. CoP: a database for characterizing co-expressed gene modules with biological information in plants. *Bioinformatics* 26: 1267-1268.
- Rischer, H., Oresic, M., Seppanen-Laakso, T., Katajamaa, M., Lammertyn, F., Ardiles-Diaz, W., Van Montagu, M.C., Inze, D., Oksman-Caldentey, K.M. & Goossens, A. 2006. Gene-to-metabolite networks for terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 5614-5619.
- Sønderby, I.E., Burow, M., Rowe, H.C., Kliebenstein, D.J. & Halkier, B.A. 2010. A complex interplay of three R2R3 MYB transcription factors determines the profile of aliphatic glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 153: 348-363.
- Sønderby, I.E., Hansen, B.G., Bjarnholt, N., Ticconi, C., Halkier, B.A. & Kliebenstein, D.J. 2007. A systems biology approach identifies a R2R3 MYB gene subfamily with distinct and overlapping functions in regulation of aliphatic glucosinolates. *PLoS ONE* 2: e1322.
- Saito, K., Hirai, M.Y. & Yonekura-Sakakibara, K. 2008. Decoding genes with coexpression networks and metabolomics - 'majority report by precogs'. *Trends Plant Sci.* 13: 36-43.
- Sawada, Y., Kuwahara, A., Nagano, M., Narisawa, T., Sakata, A., Saito, K. & Hirai, M.Y. 2009a.

- 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.
- Sawada, Y., Toyooka, K., Kuwahara, A., Sakata, A., Nagano, M., Saito, K. & Hirai, M.Y. 2009b. Arabidopsis bile acid: sodium symporter family protein 5 is involved in methionine-derived glucosinolate biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 50: 1579-1586.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. & Lohmann, J.U. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37: 501-506.
- Schoendorf, A., Rithner, C.D., Williams, R.M. & Croteau, R.B. 2001. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 1501-1506.
- Schopfer, C.R. & Ebel, J. 1998. Identification of elicitor-induced cytochrome P450s of soybean (*Glycine max* L.) using differential display of mRNA. *Mol Gen Genet.* 258: 315-322.
- Schopfer, C.R., Kochs, G., Lottspeich, F. & Ebel, J. 1998. Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6a-hydroxylase, an enzyme specific for pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). *FEBS Lett.* 432: 182-186.
- Tieman, D., Taylor, M., Schauer, N., Fernie, A.R., Hanson, A.D. & Klee, H.J. 2006. Tomato aromatic amino acid decarboxylases participate in synthesis of the flavor volatiles 2-phenylethanol and 2-phenylacetaldehyde. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 8287-8292.
- Tohge, T., Nishiyama, Y., Hirai, M.Y., Yano, M., Nakajima, J.-i., Awazuhara, M., Inoue, E., Takahashi, H., Goodenowe, D.B., Kitayama, M., Noji, M., Yamazaki, M. & Saito, K. 2005. Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing a MYB transcription factor. *Plant J.* 42: 218-235.
- van der Fits, L. & Memelink, J. 2000. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* 289: 295-297.
- Yamazaki, M. & Saito, K. 2011. Molecular genetic study on the anthocyanin chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Nat Prod Commun* 6: 423-427.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Matsuda, F., Nakabayashi, R., Takayama, H., Niida, R., Watanabe-Takahashi, A., Inoue, E. & Saito, K. 2008. Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 2160-2176.
- Yonekura-Sakakibara, K., Tohge, T., Niida, R. & Saito, K. 2007. Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in Arabidopsis by transcriptome coexpression analysis and reverse genetics. *J. Biol. Chem.* 282: 14932-14941.
- Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pré, M., Gantet, P. & Memelink, J. 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 67: 61-71.
- Ziegler, J., Voigtlander, S., Schmidt, J., Kramell, R., Miersch, O., Ammer, C., Gesell, A. & Kutchan, T.M.

2006. Comparative transcript and alkaloid profiling in *Papaver* species identifies a short chain dehydrogenase/reductase involved in morphine biosynthesis. *Plant J.* 48: 177-192.
- Zulak, K.G., Cornish, A., Daskalchuk, T.E., Deyholos, M.K., Goodenowe, D.B., Gordon, P.M., Klassen, D., Pelcher, L.E., Sensen, C.W. & Facchini, P.J. 2007. Gene transcript and metabolite profiling of elicitor-induced opium poppy cell cultures reveals the coordinate regulation of primary and secondary metabolism. *Planta* 225: 1085-1106.