

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18897

研究課題名(和文) NMRを用いたメタボローム解析による植物二次代謝の種内多様性誘導因子の解明

研究課題名(英文) Exploration of a factor participating in intra-specific diversity in plant secondary metabolism using NMR metabolomic analysis

研究代表者

齋藤 義紀 (SAITO, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：30441588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本邦産*Lavandula angustifolia*および中国産*Ligularia vellerea*が生育地依存的に異なる成分組成を有することを明らかにした。それらの抽出エキスのNMRメタボローム解析を実施した結果、前者は3群、後者は2群の成分タイプに分類され、その分類に寄与する指標成分を同定した。*L. angustifolia*については、抗酸化活性を有する芳香族成分のみに絞った地域性も明らかにした。また、*Ligularia lamarum*における成分組成、塩基配列、ならびに地理的分布間の関係性に多様なパターンが存在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：*Lavandula angustifolia* and *Ligularia vellerea* growing in different area of Japan and China, respectively, were found to be intra-specifically diverse in their chemical constituents. Chemical composition of *L. angustifolia* and *L. vellerea* was grouped into 3 and 2 types, respectively, using NMR metabolomic analysis of their extracts. The ingredient corresponding to the first principal component was identified for each species. Variation in composition of antioxidative aromatic substances among the *L. angustifolia* individuals growing in different areas was also evaluated. Intra-specific diversity in *Ligularia lamarum* was found to be more complex than previously known with regard to its chemical composition, nucleotide sequences, and geographical distribution.

研究分野：天然物化学

キーワード：種内多様性 メタボローム 二次代謝産物 高等植物 NMR

1. 研究開始当初の背景

植物二次代謝系は驚異的な多様性を有しており、人類はその中から数々の医薬品のリード化合物を享受してきた。近年、多くの天然資源のゲノム解読が進んだことで、予想を遙かに超える数の二次代謝産物生合成遺伝子が休眠状態で存在することが明らかにされている。中でも高等植物は生合成関連遺伝子を数多く有しており、最も身近な天然資源でありながら成分的に未知の部分が多く残されている。この潜在的な二次代謝機能の発現は、新たな有用物質の獲得につながるものと期待される。

申請者は、これまでにキク科を中心とする国内外の様々な野生植物について、化学成分、塩基配列、および地理的分布といった複合的な観点から、種内多様性の実態を明らかにしてきた。多様化の規模・様式は種によって様々であったものの、多くの種で主成分や塩基配列パターンの違いに基づく種内グループの存在を見だし、地理的分布も含めた相関関係を明らかにした。同一種であっても、異なる地点で採集した試料の成分はしばしば大きく異なり、中には成分の一部だけでなく組成全体が大きく異なる事例も見いだされた。この過程では、非常に多くの新規化合物も発見した。

野生個体におけるバリエーションの形成は何らかの環境因子によってもたらされていると推測される。この機構を解明して他の種にも応用できれば、新たな二次代謝産物の探索源として、個々の種の価値が格段に高まり、例えば、①天然由来の多様な医薬品シーズを獲得する機会の増大、②医薬品や食品工業材料として有用な機能性成分の効率的取得、③天然由来のケミカルライブラリーの充実、④希少資源由来成分の他種からの獲得、⑤生薬や農作物の品質管理・保護・改良、等に資するものと期待できる。しかし、具体的にどのような因子が寄与しているのかは明らかになっていない。これを特定するためには、まず各試料の含有成分を包括的に評価して特徴を明確にした上で各種環境因子との相関を検討する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、高等植物の潜在的な二次代謝機能を引き出してより多様な構造の天然物を獲得するために、自然界における産生成分の多様化メカニズムを解明することを最大の目的とする。

同一種の植物であっても、異なる生育環境下ではしばしば産生成分の組成が大きく異なる。こうした多様化は、何らかの環境因子によって生合成関連遺伝子の発現状態が変化した結果起こるものと推測される。そこで、本研究ではそのような種内多様性を有する野生個体群に着目し、特にそれらの成分組成の違いと生育地点における各種環境因子との相関について主要なものを明らかにする。

その知見に基づいて産生成分を人為的に制御する方法を確立する。さらに、環境因子の作用点、および実際に発現誘導される遺伝子といった多様化機構の全容解明に迫り、類似の機構を持つ他の種への応用展開を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、これまでに蓄積してきた様々な規模・様式の化学的種内多様性に関する膨大なデータを踏まえ、特に地域依存的に高度な種内多様性を有する野生種を対象として、生育環境の調査と NMR メタボローム解析による成分の包括的な評価を組み合わせたアプローチを行う。

(1) 試料の採集と LC-MS 分析

各地に広く分布し、かつ過去の調査で成分の高度な多様化が認められた高等植物を中心に試料採集を行う。採集は、地方単位で距離的に隔離された複数地点で実施し、採集時に各種環境因子に関する情報を計測機器やキットを用いて収集する。地域差以外の影響を確認するため 1 地点につき数試料を採集し、全て別個の試料として扱う。植物には季節性があるため、できるだけ同時期に行う。得られた試料の抽出エキスを直接 LC-MS にて分析し、実際に地域依存的な種内多様性を有することを確認する。

(2) エキスの NMR メタボローム解析

試料の抽出エキスの NMR を測定し、多変量解析の一種である主成分分析にて個体ごとの特徴をプロットし、さらに成分組成に基づくグループ分類を行う。この分類に寄与する指標成分を単離・同定する。次いで、指標成分含量に対する各種環境因子の相関度を求める。

(3) 植物細胞培養による環境要因の検討

野生状態で異なる成分を産生していた個体由来の細胞をそれぞれ基本培地での人工培養に付し、指標成分の含量と相関度の高い環境因子のみを変化させることによって、その因子単独で成分組成がどのように変化するかを検証する。

(4) 成分の網羅的探索

化学的種内多様性は、新物質探索の観点においても有望である。同一種内で異なる LC パターンを示した試料については、それぞれ成分を詳細に分離・精製し、構造決定を行うとともに、LC-MS 分析で得られたクロマトグラムの主要なピークの帰属を行う。

4. 研究成果

(1) 試料の採集と LC-MS 分析

試料の採集は長崎県、徳島県、北海道にて行い、*Eupatorium* 属、*Senecio* 属、*Angelica* 属植物を得た。また、全国各地の圃場で栽培された *Lavandula* 属植物、中国産の *Ligularia* 属および *Eupatorium* 属植物を別途入手した。各試料の成分を HPLC にて分析し、種内多様性が顕著なものとして本邦産の *L. angustifolia* および中国産の *L. vellerea* を見出した。

(2) *L. angustifolia* に関する検討

日本国内の様々な地域で栽培された *L. angustifolia* 計 20 試料の新鮮花部より得た水抽出エキスの ^1H NMR スペクトルを同一条件にて測定し、主成分分析を行い、PCA スコアプロットを作成した (図 1)。その結果、大分産と北海道産のものがそれぞれ分離し、計 3 群に分類された。この分類に寄与する成分の分離・同定を試みたところ、糖などの一次代謝産物が寄与成分であることが判明した。

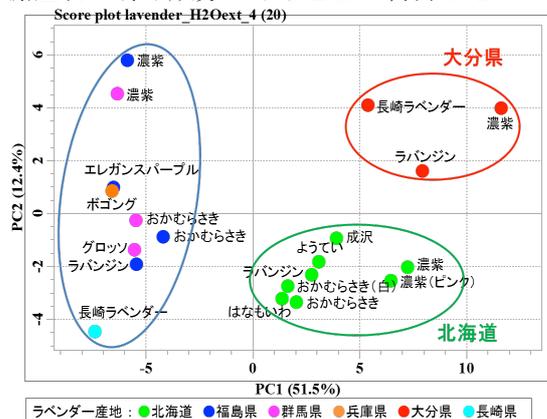


図 1 *L. angustifolia* の PCA スコアプロット

一方、上述のエキスの ORAC 活性を測定したところ、3.1–6.8 mmol TE/g の範囲で試料間の違いが認められた。この活性にはシソ科特有の芳香族成分が寄与していると推測されたことから、LC-DAD を用いてそれらに焦点を当てた分析を行った。その結果、主要なピーク成分は共通していたが、含量にかなりのばらつきが見られた。典型的なクロマトグラムを図 2 に示す。

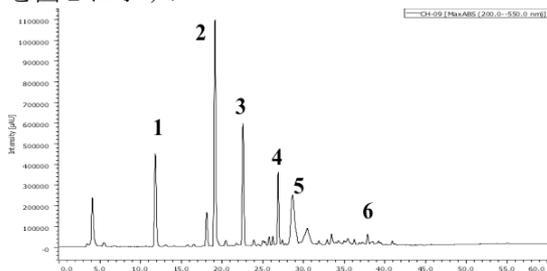


図 2 水抽出物の LC-DAD クロマトグラム例

これらの成分を分離・精製し、1 種の新規化合物を含む 6 種の化合物を得た (図 3)。新規化合物 5 の構造は、各種二次元 NMR に加え、図 4 に示す誘導体化反応によっても確認した。

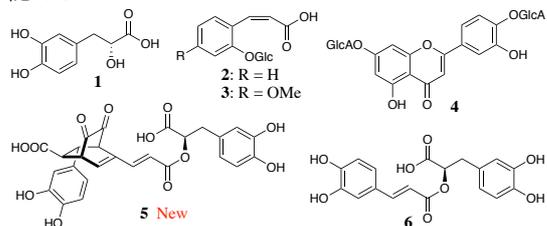


図 3 エキス中の主要芳香族成分

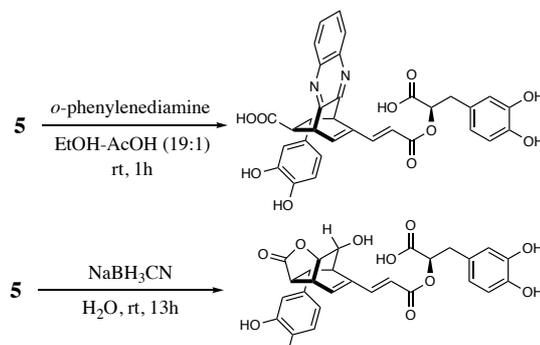


図 4 新規化合物 5 の誘導体化

主要芳香族成分 1–6 の中で最も高い ORAC 活性を示したのは、新規化合物 5 (7.7 mol TE/mol) であった。成分タイプが異なる野生個体から得た細胞の人工培養による成分タイプの相互変換に着手し、引き続き検討を行っている。

(3) *L. vellerea* に関する検討

中国雲南省で採集した *L. vellerea* 計 10 試料のエタノール抽出物について、 ^1H NMR スペクトルを同一条件にて測定し、主成分分析を行い、PCA スコアプロットを作成した (図 5)。その結果、2 群の成分タイプに分類された。

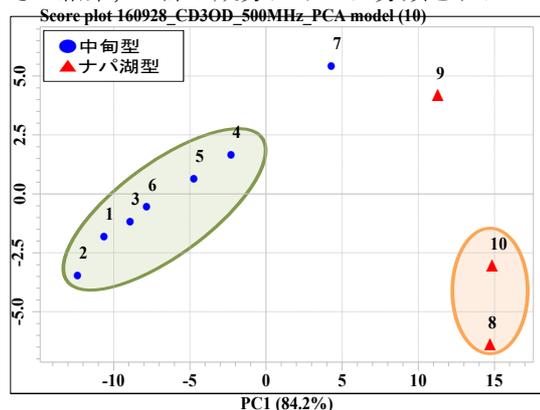
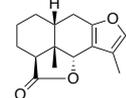


図 5 *L. vellerea* の PCA スコアプロット

生育地域の近いものは同じグループに分類されており、成分組成の違いが地理的・環境的要因によってもたらされたものであることが示唆された。分類に基も寄与した成分は、右に示すフラノエレモフィラン型のセスキテルペンであった。



(4) *L. lamarum* およびその他の種の検討

L. lamarum 計 7 試料も、LC-MS 分析において化学的種内多様性を有することが確認された (図 6)。しかし、試料 1 と 2 はほぼ同じ地点で採集したため、環境因子が要因ではないと推測された。そこで、核 ITS 領域の塩基配列を解析し、遺伝的要因の寄与について検討した。その結果、予想に反して試料 3 におのみ交雑の痕跡が認められ、成分タイプとは対応しなかった。このことは、遺伝子侵入が

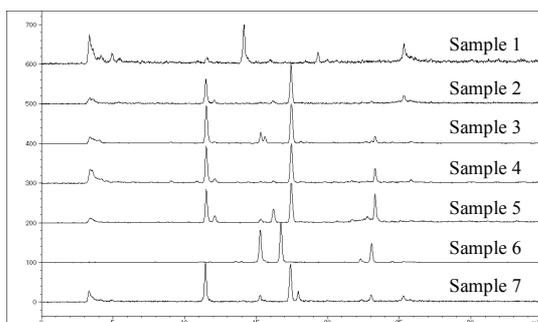


図6 *L. lamarum* の HPLC クロマトグラム

必ずしも成分組成の変化をもたらすわけではないこと、および個体特異的な成分変化の要因が存在することを示唆している。今後は、個体レベルのより詳細な調査が必要であると考えられる。

その他、前年度までに採集した試料の中で、LC-MS 分析の結果成分に関する種内多様性が顕著であった *Eupatorium* 属や *Ligularia* 属植物についても個別に詳細な成分分析を実施し、研究期間を通じて計 54 種の新物質を単離・構造決定した。

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 5 件)

- ① Y. Saito, Y. Shiosaki, M. Fujiwara, K. Mihara, H. Nakamizo, K. Otose, Y. Okamoto, K. Nakashima, R. Hanai, C. Kuroda, X. Gong, Y. Matsuo, T. Tanaka, M. Tori. Eremophilanes from *Ligularia hookeri* collected in China and structural revision of 3 β -acyloxyfuranoeremophilan-15,6-olide. *Chem. Pharm. Bull.* **2018**, in press. (査読有)
- ② Y. Saito, M. Ichihara, Y. Takashima, Y. Okamoto, X. Gong, R. Hanai, C. Kuroda, M. Tori. Chemical constituents of hybrids of *Ligularia cyathiceps* and *L. lamarum*/*L. subspicata* collected in China: Structures of subspicatin M, N, O₁, and O₂, and related compounds. *Phytochemistry* **2017**, *140*, 69–76. (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.015>
- ③ Y. Saito, M. Hidaka, A. Fukuda, Y. Okamoto, K. Nakashima, M. Tori, R. Hanai, X. Gong, E. Watanabe, C. Kuroda. Intra-specific diversity of the chemical composition of *Ligularia lamarum* in the Hengduan Mountains, China: The structures of four new eremophilanes and a new seco-eremophilane. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 139–145. (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.04.026>
- ④ H. Morikawa, Y. Saito, Y. Matsuo, H. Maeda, T. Tanaka. Eudesmane sesquiterpenoids from

the wood of *Platycarya strobilacea*. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 905–908. (査読有)

<http://www.naturalproduct.us>

- ⑤ Y. Saito, Y. Takashima, Y. Okamoto, X. Gong, R. Hanai, C. Kuroda, M. Tori. Three new eremophilanes from a *Ligularia* hybrid collected in China. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 901–904. (査読有)
<http://www.naturalproduct.us>

[学会発表] (計 14 件)

- ① 田崎友亮, 齋藤義紀, 松尾洋介, 田中 隆, Xun Gong. 中国四川省産 *Ligularia pleurocaulis* の成分研究. 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25 日~26 日 (熊本県熊本市)
- ② 汐崎優子, 齋藤義紀, 花井 亮, 松尾洋介, 田中 隆, Xun Gong. *Ligularia hookeri* 及び *L. subspicata* の成分研究. 第 34 回日本薬学会九州支部大会, 2017 年 11 月 25 日~26 日 (熊本県熊本市)
- ③ 齋藤義紀, 岡本育子, 市原麻由, 高島由利子, 田邊沙也子, 青山奈央, 清水杏菜, 渡辺 静, 張 寧寧, Xun Gong, 花井 亮, 通 元夫, 黒田智明. 中国雲南省香格里拉県天池産 *Ligularia* 雑種の化学成分と ITS 塩基配列. 第 59 回天然有機化合物討論会, 2017 年 9 月 20 日~22 日 (北海道札幌市)
- ④ 通 元夫, 藤原美保, 汐崎優子, 齋藤義紀, 中島勝幸, 岡本育子, Xun Gong, 花井 亮, 黒田智明. 中国産 *Ligularia hookeri* の化学成分. 第 61 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2017 年 9 月 9 日~11 日 (石川県野々市市)
- ⑤ 齋藤義紀, 日高基貴, 福田あかね, 岡本育子, 中島勝幸, 通 元夫, 花井 亮, Xun Gong, 渡邊永治, 黒田智明. 中国四川省産 *Ligularia lamarum* のケモタイプと交雑. 第 61 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2017 年 9 月 9 日~11 日 (石川県野々市市)
- ⑥ 齋藤義紀, 市原麻由, 高島由利子, 岡本育子, Xun Gong, 花井 亮, 黒田智明, 通 元夫. 中国雲南省産 *Ligularia cyathiceps* と *L. lamarum*/*L. subspicata* との雑種の化学成分. 第 61 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2017 年 9 月 9 日~11 日 (石川県野々市市)
- ⑦ 日高基貴, 齋藤義紀, 松尾洋介, Xun Gong, 田中 隆. 中国産 *Aconitum* 属植物の成分研究. 第 33 回日本薬学会九州支部大会, 2016 年 12 月 3 日~4 日 (鹿児島県鹿児島市)
- ⑧ 山口千尋, 齋藤義紀, 松尾洋介, 田嶋幸一, 田中 隆. ラベンダー水性エキスの ¹H NMR メタボローム解析および長崎ラベンダー成分の網羅的探索. 第 33 回日本薬学会九州支部大会, 2016 年 12 月 3 日~4 日 (鹿児島県鹿児島市)

- ⑨ 齋藤義紀, 岡本育子, 松尾洋介, 田中 隆, 黒田智明, Xun Gong. 中国雲南省産 *Ligularia lankongensis* より得られた含塩素ピサボラン型セスキテルペン. 第60回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2016年10月29日~31日(北海道網走市)
- ⑩ 黒田智明, 柴山千絵美, 井上恭輔, 岡本育子, 通 元夫, 齋藤義紀, 花井 亮, Xun Gong. 中国四川省および重慶市産 *Ligularia fischeri* の成分系列. 第60回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2016年10月29日~31日(北海道網走市)
- ⑪ 齋藤義紀, 谷口瑞穂, 佐々木陽子, 三浦唯, 岡本育子, 中島勝幸, 大崎愛弓, 永野肇, 八百板康範, Xun Gong, 花井 亮, 黒田智明, 通 元夫. 中国四川省産 *Ligularia brassicoides* および *Ligularia liatroides* の化学成分と塩基配列. 第58回天然有機化合物討論会, 2016年9月14日~16日(宮城県仙台市)
- ⑫ C. Kuroda, S. Tanabe, N. Aoyama, Y. Suzuki, H. Yamada, H. Nagano, R. Hanai, Y. Okamoto, M. Tori, X. Gong, Y. Saito. Chemical constituents of hybrids between *Ligularia duciformis*/*Ligularia nelumbifolia* and other *Ligularia* species. The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016年9月1日~4日(徳島県徳島市)
- ⑬ Y. Saito, Y. Takashima, M. Ichihara, Y. Okamoto, X. Gong, R. Hanai, C. Kuroda, M. Tori. Chemical constituents of hybrids of *Ligularia cyathiceps* and *Ligularia lamarum*/*Ligularia subspicata* collected in China. The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016年9月1日~4日(徳島県徳島市)
- ⑭ K. Kuwada, H. Kawabe, Y. Saito, Y. Okamoto, M. Tori, X. Gong, H. Hirota, A. Ohsaki. Chemical constituents of *Salvia* species collected in Sichuan Province of China. The International Symposium on Natural Products for the Future 2016 (ISNPF2016), 2016年9月1日~4日(徳島県徳島市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/natpro/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 義紀 (SAITO, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
准教授

研究者番号: 30441588