

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03766

研究課題名(和文) オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価

研究課題名(英文) Development of core collocation in garlic genetic resources through integrated omics analysis and its evaluation for functionality

研究代表者

執行 正義 (SHIGYO, MASAYOSHI)

山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授

研究者番号：40314827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム、トランスクリプトーム、メタボロームやフェノームを統合解析して代謝産物の量的変化や表現形質の発現に直接関与する遺伝子を明らかにすることをオミクス統合解析という。ネギ類において健康機能性に着目した素材開発を行う場合には、この解析手法から得られる情報をバイオインフォマテック手法により加工・標準化した統合データベースが必要となる。そこで本研究では、世界各地から収集したニンニク遺伝資源を用いてオミクス統合解析を行い、得られたメタデータから生物学的な意味を抽出して有用食品素材・医薬原料の開発に繋げることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中央アジアに由来する稔性系統を含む、我々の研究グループが保有するニンニク遺伝資源は世界各地から収集した変異に富むものである。本研究の成果により、これらの遺伝資源は数々の有用変異を有するバイオリソースとしてニンニクの遺伝学や育種に広く利用でき、重要な研究用リソースと成り得ることが証明された。特に、メタボローム解析を通じて、将来的に健康食材や医薬原料となる系統が見出されており、農業生産分野に止まらず広くライフサイエンス分野への科学的貢献が見込める成果として今後の研究の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Our research via the use of unique genetic resources was carried out enable a holistic approach to profile the phytochemical composition as well as its related gene expression of alliums for functional material studies, through collaborative development of resources for metabolomics-high throughput chemical profiling by mass spectrometry, together with transcriptomics assay metadata by RNA-Seq. The metabolomics analysis of worldwide germplasm collection in garlic (*Allium sativum* L.) proved to be effective in evaluating its genetic diversity. Our main focus was to select useful food and/or medical materials amongst the mapping various genotypes and phenotypes. An omics approach could be utilized to characterize variation in these genetic stocks, developing capability and plant materials to support metabolomics-informed plant breeding studies.

研究分野：野菜園芸学

キーワード：ニンニク オミクス統合解析 遺伝資源 コアコレクション SNP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニンニクの遺伝資源収集活動は多くの国々で活発に行われており、文献情報から現状を整理すると図1のようになる。我が国における収集活動は、1983年より鹿児島大学の衛藤威臣博士(現名誉教授)により開始され、起源中心に近い中央アジアや地中海沿岸地域等から、これまでに約500系統が導入されている。これらの中の天山山脈北西部から得られた系統群に、通常の栽培ニンニクにはない稔性を有する系統が見出され、種子繁殖性品種の開発に繋がる貴重な遺伝資源として育種家の関心が集まっている。

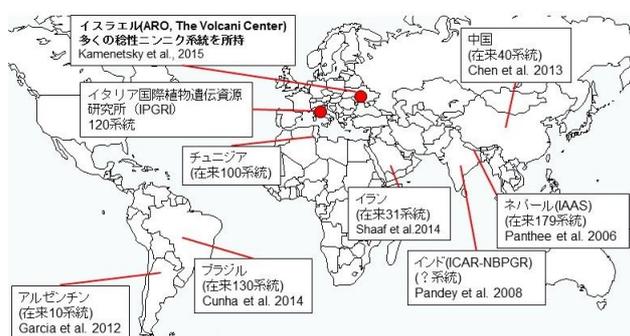


図1 ニンニク遺伝資源を保有する世界の研究機関

また、ニンニクは健康増進に寄与する食材であり、米国立癌研が提示したデザイナーズフードピラミッドの頂点に君臨している。化学成分に関する研究は以下のように古くから行われている。独のベルトハイムは1844年、鱗茎を潰してから煮立て、水蒸気と一緒に蒸発してくる成分を、冷却管を通じて黄色い油分として集めることに初めて成功し、独特の匂いの中に有効成分が含まれることを最初に明らかにした。その後、独のゼムラーによる元素分析により、その化学組成が解明され、1892年に硫化アリルと称する一連の代謝物(ジアリルスルフィド等)が同定された。さらに、1944年に米のカバリトとベイリーは、これらの前駆物質として無臭のイオウ化合物(アリイン)の存在を明らかにし、細胞を傷つけることで発生する匂い発生のメカニズムを分解酵素アリナーゼの作用とともに解明し、匂い成分となるアリシンを特定した。一方で、アリイン生合成の基質となる物質や分解物の機能性に関する新たな知見が、1951年の藤原元典博士によるアリチアミン(B₁活性持続性ビタミン)の発見を皮切りに、メチルアリルトリスルフィドによる抗血栓作用(有賀ら1981)、S-アリルシステインによる脳の萎縮抑制や学習能力向上効果(西山ら1998)等のように次々と日本人研究者により見出されている。さらに、近年、山口大医学部にて、ネギ類成分抽出物中に血管病予防効果を示す物質が存在することを示唆する試験結果が得られており(Kobayashiら2012)、今後の研究の進展が期待されている。

一方で、ニンニクゲノムはイネの約32倍にあたる約159億塩基対(16.4 pg/1C)を包含している(Ricrochら2005)。この巨大ゲノムは研究者の解析意欲を減退させ、連鎖地図作成からなるゲノム解析も限定的に行われており、21世紀初頭に漸くウィスコンシン大学のグループがニンニク連鎖地図作成に着手した(Ipekら2005; Zewdieら2005)。また、巨大なゲノム配列解析と比較して、次世代シーケンサーを用いた転写産物の網羅解析は比較的容易で、ニンニクにおいても中国(Sunら2012)、イスラエル(Kamenetskyら2015; Shemesh-Mayerら2016)、アメリカ(Havey・Ahn2016)のグループがそれぞれ異なる目的でビックデータを収集、蓄積および分析している。

申請者は、2010年に鹿児島大学より山口大学へ移管されたニンニク103系統を用いて栽培科学・生化学的手法による遺伝資源の類型化を試みた。その結果、起源地から各地への伝播過程で可稔性から不稔性へ、そして完全抽苔型から不完全非抽苔型へと変化した進化モデルを見出すとともに、鱗茎内の化学成分組成を変化させて高い環境適応力を獲得したプロセスを明らかにした(Hirataら2016a)。また、酵素多型を用いた遺伝的多様性評価により、中央アジア(起源地)や地中海地域では高いヘテロ接合度がみられ、他の地域では低い傾向がみられた。さらに、地中海南東部、東南アジアや日本の諸島由来の系統では、有意にハーディー・ワインベルグ平衡から逸脱する遺伝子座が存在し、これら地域において自然あるいは人為選抜が行われた形跡が検出された(Hirataら2016b)。一方で、鳥取大乾燥地研究センターにおいて行った約100系統の非生物的ストレス耐性評価の試験結果と生化学特性データを統合して主成分分析を行ったところ、世界の遺伝資源は3グループに大別され、我が国の品種・系統のグラフ内での分布域は非常に広く、実に様々な表現型や遺伝子型を栽培利用していることが示唆された。理化学研究所代謝システム研究チームでは、タマネギに適したハイスループットメタボローム分析による大規模代謝プロファイル解析とデータマイニング用の研究基盤(S-オミクス)の開発を終えており(Nakabayashiら2013)、約200種類の代謝物(含硫化合物、フラボノイド類、サポニン類等)について大まかな定性・定量分析を実施することができる。また、山口大学がかずさDNA研究所・東北大学と連携して構築した転写産物解析用研究基盤Allium TBD(<http://alliumtdb.kazusa.or.jp>)の運用が開始されており、メタボローム研究基盤と連動させることでオミクス統合解析を行うことも可能である。

本研究で利用する遺伝資源は、2012 年度に山口大学より農研機構野菜花き研究部門へ移管した 88 系統と同部門が保有する 150 系統で構成される（計 233 系統）。本研究では、タマネギを植物材料として構築したオミクス解析用研究基盤をニンニクに適用し、以下の多方面に及ぶビックデータの収集を目指す。転写産物解析データに関しては、Transcriptome-based genotyping により各ニンニク系統の 1,000 座以上の SNP（一塩基多型）を一挙に決定し、遺伝資源がもつ遺伝的多様性を最大限含む最小の系統セット、すなわちコアコレクションを DNA マーカー遺伝子型に基づいて選定する。また、オミクス統合解析を実施することでニンニクの各種代謝産物の生合成や代謝に関与する遺伝子の特定を行い、特にコアコレクションを構成する各系統を特徴付ける SNP マーカーを獲得する。また、コアコレクションから代謝産物特性が異なる 10 系統を選抜し、好中球の免疫反応を使った抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験 [浜松ホトニクス(株)] を実施して各指標と関連のある成分を特定するとともに健康機能性の客観的評価を行う。さらに、山口大学医学部において血管異常収縮の抑制効果を検証し、より疫学的に健康機能性を評価する。

2. 研究の目的

ニンニクはタマネギ同様に年間生産量の多いネギ属香辛野菜である。ニンニクを人類が栽培した歴史は古く、紀元前 23 世紀のエジプトまで遡ることができ、ピラミッド建設に従事した労働者の食生活改善に貢献した。ニンニクは長い人類発展の歴史の中で積み重ねられた‘伝統的な知識’の中で健康食材と考えられており、このことは今日の医科学分野での基礎研究や広範な臨床研究においても立証されている。本研究では、機能性代謝物の宝庫‘ニンニク’の化学内容成分群（含硫化合物、フラボノイド類、サポニン類等）に着目し、世界中から収集された遺伝資源からなるバイオリソースのオミクス統合解析により複雑な代謝系やその遺伝系を紐解きながら、持続可能な農業生産に寄与する健康機能性をもつ食品・医薬原料素材の獲得を目指す。

3. 研究の方法

遺伝子（ゲノム）、転写産物（トランスクリプトーム）、代謝産物（メタボローム）や表現形質（フェノーム）を網羅的に解析する研究手法を‘オミクス’と称し、それらを統合解析して代謝産物の量的変化や表現形質の発現に直接関与する遺伝子を明らかにすることをオミクス統合解析という。ネギ類において健康機能性に着目した素材開発を行う場合、この解析手法から得られる情報をバイオインフォマテックス手法により加工・標準化したオミクス統合データベースが必要となる。本研究では、世界各地から収集したニンニク遺伝資源を用いたオミクス統合解析を行い、得られたメタデータから生物学的な意味を抽出して有用食品素材・医薬原料の開発に繋げるために、以下の項目に示す通りにニンニク遺伝資源から得られるオミクスデータを収集するとともに、その健康機能性を行った；【1】遺伝資源の農業形質評価，【2】トランスクリプトーム解析，【3】メタボローム解析，【4】抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価，【5】血管収縮評価試験。

【1】については、山口大学が提供したニンニク遺伝資源 87 系統に農研機構野菜花き研究部門の 143 系統を加えた計 230 系統について調査を実施した。それぞれの母球を 2018 年 10 月に野菜花き研究部門内試験圃場に定植し、翌年 6 月 26 日に各系統を収穫後、地上部（草丈、葉身長、葉身幅、葉枚数、下位葉鞘長、葉鞘径、抽苔率）ならびに地下部（球径、球重、側球数）の諸特性を各系統につき 5 個体を用いて調査した。

【2】では、ニンニク遺伝資源解析の代表系統として‘ホワイト六片’を選抜し、葉、根、バルブの 3 組織から RNA を抽出し Illumina NextSeq シーケンサーを用いて配列解析を行なった。得られた配列情報を PRINSEQ と FastX-toolkit により精査した後、Trinity v2.5.1 を用いてアセンブルを実施しニンニク unigene セットを構築した。ニンニク遺伝資源から採取地域の情報や栽培形質の情報を基にニンニク遺伝資源から 37 のコア系統を選抜し、葉の組織より抽出した RNA サンプルを用いて配列解析を行なった。得られた RNA-seq リードを RSEM1.3.0 で unigene セットのリファレンス配列にマッピングすることにより、ニンニクコア系統の SNP 情報の収集・整理を行なった。

【3】に関しては、ニンニク遺伝資源における葉身部由来代謝産物の全容を明らかにするために 101 系統のメタボローム解析を行い、それぞれに特徴的な代謝プロファイルを確認した。次に、青果ニンニク可食部位で特異的にみられる代謝産物を同定するために、ニンニク 4 系統とともにタマネギ 1 系統、シャロット 1 系統とニンニク加工品 1 種類を用いた小鱗片メタボローム解析を行った。両実験ともに、粉末化サンプルを 80% MeOH で抽出した後、前処理として窒素ガスによる溶媒の乾固、超純水による再溶解およびフィルトレーションを行い、終濃度 40 ng/μL の抽出溶液 1.5 μL を液体クロマトグラフィー・タンデム四重極型質量分析装置（LC-QqQ-MS）によるメタボローム解析に供試した。LC-QqQ-MS では、超高感度検出が可能な selected reaction monitoring (SRM) の条件と溶出時間を 427 種の標準化合物について最適化し、各サンプルの測定を行った。各代謝産物のシグナル強度（ピークエリア値）の正規化（log₂ 変換）とスケールリング（z-score 化）を行い、サンプル毎に特徴

的な代謝産物を主成分解析およびヒートマップ解析で調査した。

【4】においては、ニンニク4品種（‘ホワイト六片’，‘壱岐’，‘60’および‘スペイン’）の側球部位，タマネギ1系統（‘札幌黄’由来倍加半数体‘DHC’）およびシャロット1系統（‘チェンマイ’由来倍加半数体‘DHA’）の鱗葉球部位を用い，これらを凍結乾燥して粉末状にしたものをDMSOに溶解し，得られた溶液を実験に供試した．試験手法としては，HL-60細胞（急性前骨髄性白血病細胞）をDMSOにて分化誘導して得られた好中球様細胞をfMLPで刺激した際に生じる細胞質内カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）濃度上昇と，それに伴って惹起されるスーパーオキシドアニオン（ O_2^- ）産生を，それぞれカルシウム検出用試薬（Fluo-3-AM）の蛍光およびスーパーオキシド検出用試薬（MCLA）の化学発光により検出し，蛍光と化学発光を同時モニタリングする技術を採用した．測定機器として，蛍光・化学発光同時測定装置（浜松ホトニクス，CFL-C2000）を用い，溶液由来成分の存在で生じた蛍光と化学発光の量的な変化から，試料がもつ機能性について，A：抗酸化作用（活性酸素除去作用），B：抗炎症作用（細胞内への Ca^{2+} の取り込みを阻害し，活性酸素産生を抑え過剰な炎症反応を抑制する作用）およびC：自然免疫賦活作用（ O_2^- 産生を亢進している）の3つの生理活性を識別した．なお，溶液濃度は0.1~100mg/mLの間で数段階に変化させて測定を行った．

【5】の試験では，実験用植物材料として，ニンニクを含む4種類のネギ属植物材料（W，X，Y，Z）の鱗茎を凍結乾燥したものを使用した．ブタ冠動脈の中膜平滑筋条片を作成し，等尺性収縮を測定した．血管平滑筋に反復性脱分極刺激を与えて，静止時張力および脱分極による収縮を最適化した後に，正常収縮として，40mM K^+ 脱分極刺激による Ca^{2+} 依存性収縮を観察し，あるいは，異常収縮として，30 μ M SPCによる Ca^{2+} 非依存性収縮を観察した．それぞれの収縮が定常状態に達した後，食用植物材料としてネギ属植物材料を添加し，血管収縮に対する抑制効果を比較検討した．

4．研究成果

【1】：ニンニク遺伝資源を収集地域（日本，東アジア（日本を除く），東南アジア，中央アジア，北欧（北部），北欧（南部），アメリカ大陸）でグルーピングして各特性を比較したところ，葉身長，下位葉鞘長および側球数においてグループ間で有意な違いが認められた．抽苔率は各地域で異なり，北欧（北部）系統は50.0%と低かったのに対し，中央アジア系統は97.8%と高い割合を示した．特性間の関連性をみたところ，草丈，葉身長，葉身幅および葉鞘径は球重と正の相関があることがわかった．主成分分析の結果，情報量の大きな二つの主成分が抽出され，57.6%の情報量をもつ第一主成分は下位葉鞘長以外の全ての形質について寄与率が高く，植物体の生育量を反映していた．第二主成分（12.8%）では側球数および下位葉鞘長について高い寄与率がみられた．散布図を作成したところ全系統の約94%（216系統）がプロットされた．起源中心地である中央アジア系統は広範にプロットされたが，他地域系統のプロット範囲はより広く，調査した特性に関して非常に変異に富むことが窺えた（図2）．本調査により，ニンニク遺伝資源がもつ形態および生殖に関する特性が明らかになり，優れた抽苔抵抗性，側球形成能や球肥大能をもつ系統がいくつか見出された．

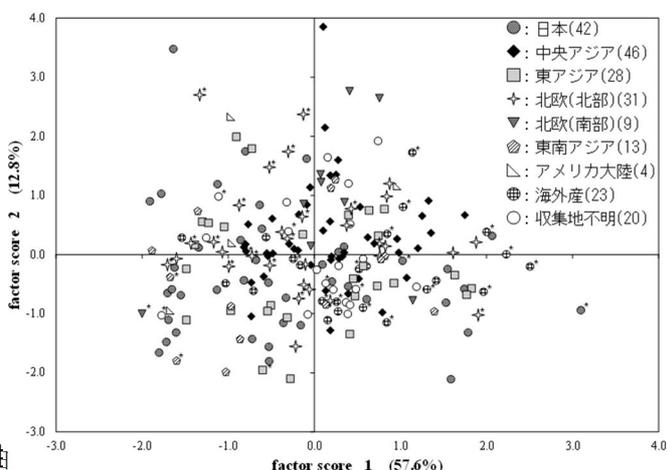


図2 ニンニク遺伝資源の諸特性に基づく第一および第二主成分スコアを用いた散布図

【2】：‘ホワイト六片’の葉，根，バルブの3組織から抽出したRNAサンプルを用いたRNA-seqを実施し，各組織から3億リードを超える配列情報を収集した．得られた配列情報をアセンブルすることにより，69,112コンティグからなるニンニク unigene セットを整備した．ニンニク unigene セットの配列を query として，DHA unigene（シャロットの倍加半数体の unigene セット），ARAPORT11（シロイヌナズナの遺伝子データベース），NR（Genbankのアミノ酸配列データベース）に対するホモロジーサーチにより，unigene セットのアノテーションを行なった．また，得られた unigene セットのリファレンス配列に対して各組織のリードをマッピングすることにより，3種類の組織での発現量をRPKM（Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads）値として集計し，ニンニク unigene の基本情報として整理した．200系統を超えるニンニク遺伝資源の中から選抜した37系統のトランスクリプトーム解析を実施した結果，各系統について2千万リード前後のデータが収集され，

これらの配列情報をニンニク unigene をリファレンスとしてマッピングすることによりコア系統の SNP 情報を収集・整理することができた。得られた SNP 情報を基にニンニク遺伝資源の系統関係を解析したところ、ニンニクの起源地と考えられている中央アジアの系統で構成されるクレード、地中海沿岸地域の系統を中心に構成されるクレード、東南アジアの系統を中心とするクレード、東アジアの系統を中心とするクレードからなる 4 グループに大別された (図 3)。このグルーピングは推定されているニンニクの伝播経路と対応しているものと推察され、ニンニク遺伝資源の特性を把握し、優良系統の選抜や栽培に活用していくための基礎情報として利用できるものと考えられる。

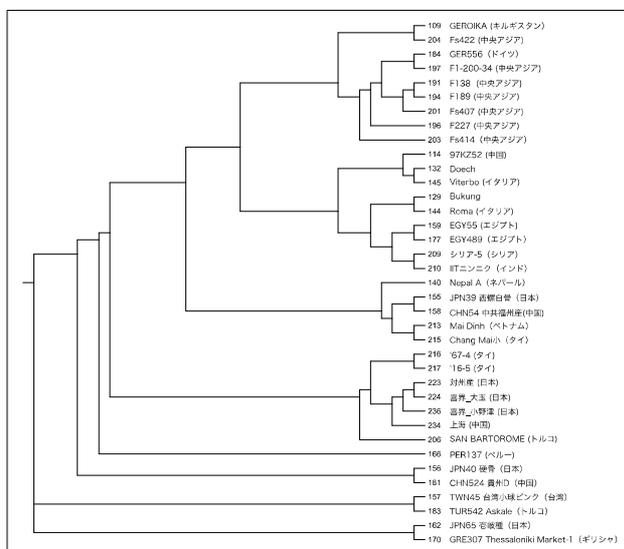


図 3 トランスクリプトーム解析による SNP 情報を基に

【 3 】：葉身部のメタボローム解析では 101 系統に特徴的な代謝産物プロファイルが得られたことから、これらの生合成制御機構に興味もたれる。ニンニク可食部小鱗片を用いて得られたメタボロームデータの主成分解析では、青果・ニンニク加工品のグループとタマネギ・シャロットのグループが第一主成分で分離した (図 4 A)。また、第二主成分では青果ニンニクとニンニク加工品が分離した (図 4 A)。これらのグループに特徴的な代謝産物を探索するために、ヒートマップ解析を行った結果、各系統に特徴的な代謝産物を同定することができた (図 4 B)。これらの結果は、ニンニク遺伝資源の有用成分の活用を促進する基盤情報であり、他のオミクス情報 (ゲノム、トランスクリプトーム) との統合解析を行うことで、多様なニンニク成分の量と質を制御する代謝関連遺伝子が解明できると期待される。

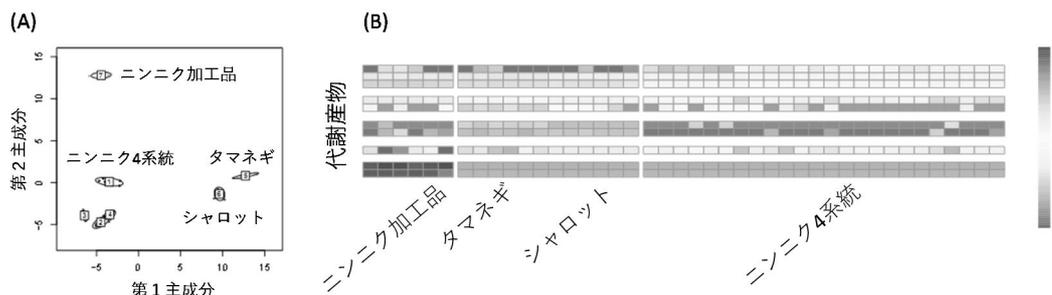


図 4 ニンニク遺伝資源の代謝プロファイル (A) 主成分解析, (B) ヒートマップ解析

【 4 】：タマネギ ‘DHC’ とシャロット ‘DHA’ では低濃度域での抗酸化作用はみられず、シャロット ‘DHA’ では 30mg/mL 以上で、タマネギ ‘DHC’ では今回評価した溶液濃度域の全範囲において自然免疫賦活作用が認められた。ニンニクにおいては、3.0~100mg/mL にかけて抗酸化作用が確認され、さらに、他の 3 品種 (‘ 香岐 ’, ‘ 60 ’ および ‘ ス페인 ’) については、30mg/mL 以上で自然免疫賦活作用が認められた。以上より、ネギ類野菜は加齢関連疾患の予防に効果的な機能性成分を含んでいること、ならびに、それぞれ特有の機能的特性を有することが示唆された。

【 5 】：3 種類のネギ属植物材料で、血圧維持を担う正常収縮にはほとんど影響を与えず、突然死を引き起こす血管異常収縮のみを特異的に抑制する顕著な傾向が認められた。これらのネギ属植物材料は、血管攣縮の治療と予防の両方を可能とするものと期待されている。

まとめ：一連の研究により、様々な解析ツールや分析手法が確立し、ニンニクに携わる栽培、育種、加工などの研究者にとって有益な情報提供がなされ始めている。特に、我々の研究グループが保有するニンニク遺伝資源は、中央アジアに由来する稔性系統をはじめ、世界各地から収集した変異に富むものである。勿論、これらの中にはアリイン等の機能性成分を豊富に含む系統も含まれており、メタボローム解析等を通じて得られる一連の研究により、将来的に健康食材や医薬原料となる系統が見出される可能性があり、農業生産分野に止まらず広くライフサイエンス分野への科学的貢献が見込める成果が量産されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平田翔・吉岡恵理・牧野日名子・數村公子・執行正義
2. 発表標題 抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活同時評価細胞試験によるネギ類野菜の機能性評価
3. 学会等名 園芸学会令和2年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 執行正義・平田翔・山田朋宏・佐藤修正・澤田有司・數村公子・小林誠
2. 発表標題 オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会テーマセッション「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田翔・山田朋宏・藤戸聡史・執行正義
2. 発表標題 ニンニク遺伝資源における農業生産関連特性の評価
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会テーマセッション「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤修正・平田翔・平川英樹・山田朋宏・執行正義
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析によるニンニク遺伝資源のSNP情報の収集・整理
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会テーマセッション「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田有司・佐藤心郎・平田翔・向江拓也・山田 朋宏・平井優美・執行正義
2. 発表標題 超高感度メタボローム解析によるニンニク代謝物の網羅解析
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会テーマセッション「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林誠・呂博超・張敏・路倩・李楠・平田翔・執行正義・張影・岸博子・森田知佳
2. 発表標題 血管の異常収縮に対するニンニクの新規機能の発見
3. 学会等名 園芸学会令和元年度秋季大会テーマセッション「オミクス統合解析によるニンニク遺伝資源・コアコレクションの構築とその機能性評価」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	澤田 有司 (SAWADA YUJI) (00415176)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員 (82401)	
研究分担者	山田 朋宏 (YAMADA TOMOHIRO) (50391412)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門・ユニット長 (82111)	
研究分担者	佐藤 修正 (SATO SHUSEI) (70370921)	東北大学・生命科学研究所・准教授 (11301)	

