

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460119

研究課題名(和文) サポニン生合成遺伝子の解析によるPanax属植物における成分的多様性の成因の解明

研究課題名(英文) Explore molecular basis underlying formation of chemical diversity in genus Panax through RNA-Seq analysis of three Panax species with different chemical compositions

研究代表者

朱 シュウ (ZHU, Shu)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：20377360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：薬用人参、三七人参等の重要な生薬の基原植物を含むPanax属植物には多様な構造と生物活性を有するトリテルペンサポニン(Ginsenosides類)が含有されており、各種が特徴的な成分組成パターンを有している。本研究は、Panax属植物における成分的多様性の成因を探ることを目的とし、分子系統学的に極めて近縁でありながら、対照的なサポニン成分組成を示すPanax属植物3種について、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行い、異なるaglyconeを持つトリテルペンサポニンの生合成に関与する酵素遺伝子及びその制御機構の分子基盤について網羅的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Genus Panax (Araliaceae), widely known as Ginseng genus, is one of the most important medicinal genera. The underground parts of almost all species in the genus are traditionally-used as medicines, including three highly-esteemed ones as Ginseng, American Ginseng and Notoginseng. Triterpene saponins, generally referred to as ginsenosides, are bioactive constituents of Ginseng drugs. Each Panax species has its own characteristic saponin composition. In this study, three Panax species with closely phylogenetical relationship but with quite different chemical compositions were focused on as representatives. Deep transcriptome analysis by next-generation DNA sequencer has been conducted on the three species to explore the molecular basis responsible for the formation of chemical diversity within genus Panax. The genes involved in biosynthetic pathway of triterpene production from the three species were compared.

研究分野：分子生薬学

キーワード：Panax属植物 RNA-Seq解析 トリテルペンサポニン 生合成遺伝子 成分的多様性

1. 研究開始当初の背景

Panax 属植物は世界に 10 数種が分布し、人參、三七人參等の重要な生薬の原植物を含め、薬用価値が極めて高い植物群である。同属植物には多様な構造と生物活性を有するトリテルペンサポニン (Ginsenosides 類) を含有しており、それらはアグリコンの骨格によって主に 4 員環のダンマラン系 (protopanaxadiol 型、protopanaxatriol 型及び ocotillol 型を含む) と 5 員環のオレアナン系に分類される。これらのサポニン成分はアグリコンの種類及び糖鎖の位置や構成の違いによって生理活性が異なっていることが知られている。

トリテルペンサポニンの生合成については、まず、メバロン酸経路を経て生成する 30 炭素の鎖状化合物である 2,3-オキドスクアレンが共通の基質となり、2,3-オキドスクアレン閉環酵素 (2,3-Oxidosqualene Cyclase, OSC) による閉環反応によってアグリコン骨格が形成され、次に生成した基本骨格に P450 による部位特異的な酸化を受けて多様な構造を有するサボゲニンが形成し、さらに糖転移酵素による配糖体化されるという経路が推定されている。*Panax* 属植物における成分的多様性の成因は、それらのサポニン生合成遺伝子の発現と制御が関わっている。

2. 研究の目的

これまでに、研究代表者らは世界各地で分布する同属植物について、遺伝子解析により各種の分子系統関係を明らかにし、また、主要なサポニン 11 成分の定量分析により、各種は特徴的な成分組成パターンを有することを明らかにした。本研究は、*Panax* 属植物における成分的多様性の成因を解明することを目的とし、分子系統学的に極めて近縁でありながら、対照的なサポニン成分組成を示す *Panax* 属植物 3 種に焦点を当て、次世代シーケンサーを用いて、比較トランスクリプトーム解析により異なるアグリコンを持つトリテルペンサポニンの生合成に関与する酵素遺伝子及びその制御機構の分子基盤について網羅的解析を行った。

3. 研究の方法

研究の材料は、同じ環境条件で栽培している *Panax* 属植物 3 種を用いた。

(1) 成分分析

3 種の地下部を凍結乾燥してから粉末にし、70%エタノールで 3 回抽出を行った。得られたそれらの 70%エタノール抽出液を島津 HPLC システムで主な 10 サポニン成分の含量を測定した。さらに、LC-ESI-LTQ/Orbitrap-MS (Thermo-Fisher 社) でサポニン成分のプロファイル进行分析し、比較した。

(2) 比較トランスクリプトーム解析

3 種の地下部、茎、葉より tRNA を抽出した。地下部より抽出した tRNA から、mRNA を精製し、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム (RNA-Seq) 解析を行った。得られた配列情報について Trinity ソフトウェアで de novo アセンブル解析を行い、コンティグ配列を得て、機能アノテーション、Gene Ontology (GO) 解析、発現量 (FPKM) 解析を行った。サポニン成分生合成経路におけるマッピングには、KEGG を使用した。得られたサポニン成分の生合成関連酵素遺伝子、特に 2,3-オキドスクアレン環化酵素 (OSC) 遺伝子について、コンティグ配列を基に RACE 法で全長配列を取得し、既知の配列と比較する。

4. 研究成果

(1) サポニン成分プロファイルの比較

同じ環境条件で栽培している *Panax* 属植物 3 種の地下部について、主な 10 サポニン成分の定量分析を HPLC で行った。3 種とも、地下部に 10%以上高含量のサポニン成分を含有していることを確認した。3 種の内、2 種には 4 員環のダンマラン系サポニンがほとんどであり、1 種には含有されるサポニン成分の 95%以上が 5 員環のオレアナン系サポニンであり、各種に特徴的な成分組成を有していることを明らかにした。さらに、LC-ESI-LTQ/Orbitrap-MS を用いて 3 種のサポニン成分プロファイルを詳細に解析・比較した。MSⁿ 分析データにより異なるアグリコンを持つ 93 サポニン成分のデータベースを作成し、3 種における 93 サポニン成分の分布を明らかにした (Fig. 1)。

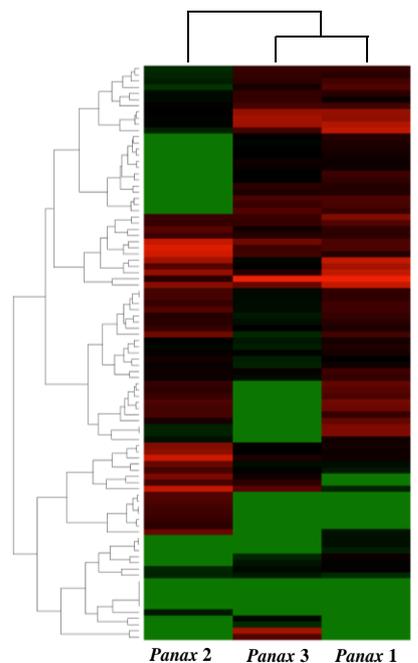


Fig. 1 Heatmap showing distribution of 93 saponins with different aglycones in the three *Panax* species with closely phylogenetic relation.

また、LC-MS の結果から、三七人參の根に微量のオレアナン系サポニンが検出された。

(2) 次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム (RNA-Seq) 解析

3 種の地下部より精製した mRNA を用いて、ライブラリを作製した。次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム (RNA-Seq) 解析を行い、3 種からそれぞれ 13.7、15.7、7.4 Gbases の塩基配列データを取得した。それらについて de novo アセンブル解析を行い、各種に 10 万以上のコンティグ配列を得た。得られたコンティグ配列は、最長が 15Kb を超えており、N50 がそれぞれ 1555、1455、1409 bp であった。コンティグ配列について、NCBI non-redundant データベース (Nr、Nt) および UniProt データベースに対して Blast 解析により機能アノテーション、及び遺伝子オントロジ (GO) 解析を行い、3 種の比較を行った (Fig. 2)。

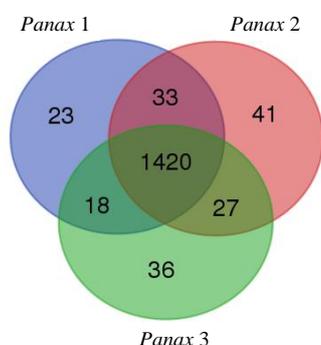


Fig. 2 Venn diagram showing shared and unique gene families among the three *Panax* species with closely phylogenetic relation, but different chemical composition. Each number represents the number of shared or unique gene families.

また、KEGG パスウェイにマッピングした結果、サポニン成分の生合成経路にかかわる 11 の酵素遺伝子について複数のコンティグがマッピングされた。3 種から得られた各酵素遺伝子の Unigenes の配列数を Table 1 に示した。

2,3-オキシドスクアレン閉環酵素 (OSC) はトリテルペンサポニン生合成において構造的多様化の分岐点に位置しており、*Panax* 属各種における OSC 遺伝子配列及びその発現制御の違いは同属植物の成分的多様性の形成において最大の要因と考えられる。これまでに薬用人參の培養毛状根より、 β -アミリン (オレアナン系サポニンの前駆体) 合成酵素遺伝子、及びダンマレンジオール-II (ダンマラン系サポニンの前駆体) 合成酵素遺伝子が同定されている。RNA-Seq 解析で得られたコンティグ配列を基に RACE 法で OSC 遺伝子の全長配列を解析した結果、3 種より 9 種類の OSC 遺伝子の全長配列を得た。配列のホモロ

ジから、9 種類のうち 5 種類がダンマレンジオール-II 合成酵素遺伝子 (DS)、4 種類が β -アミリン合成酵素遺伝子 (β -AS) であると推定した。3 種由来の両遺伝子とも、塩基配列の種内多型があったものの、種間においてそれぞれの配列が高いホモロジを示した。3 種における各 OSC 遺伝子の発現レベル (FPKM 値) を比較した結果、ダンマラン系サポニンが高含量の 2 種においては、DS 遺伝子の発現レベルが顕著に高く、一方、オレアナン系サポニンが高含量の 1 種においては、 β -AS 遺伝子の発現レベルが高かったことから、種におけるダンマラン系サポニン又はオレアナン系サポニンの含量が OSC 遺伝子 (DS 又は β -AS) の転写レベルで決定づけられていることが示唆される。また、これまでオレアナン系サポニンが報告されなかった三七人參の根より β -アミリン合成酵素遺伝子 2 種類が得られた。これは、前述の LC-MS の分析結果を支持していると思われる。

Table 1 Unigene number of respective genes involved in triterpene saponin biosynthesis from the three *Panax* species

Gene name	Unigene number			
	Species	(1)	(2)	(3)
Acetyl-CoA acetyltransferase (AACT) EC2.3.1.9		4	3	4
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase (HMGS) EC2.3.3.10		4	4	2
Mevalonate kinase (MVK) EC2.7.1.36		6	6	8
Phosphomevalonate kinase (PMK) EC2.7.4.2		6	9	10
Mevalonate diphosphate decarboxylase (MVD) EC4.1.1.33		1	3	3
Geranylgeranyl pyrophosphate synthase (GGPPS) EC2.5.1.29		18	16	16
Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) EC2.5.1.10		0	0	1
Squalene synthase (SS) EC2.5.1.21		8	7	3
Squalene epoxidase (SE) EC1.14.99.7		17	15	14
Dammarene diol-II synthase (DS) EC4.2.1.125		1	5	2
β -amyrin synthase (β -AS) EC5.4.99.39		8	3	5

多様な構造を持つジンセンノシードの生合成において、アグリコン骨格が形成された後、P450 による骨格上の部位特異的な酸化修飾、さらに糖転移酵素による配糖体化反応が不可欠である。これまでに、薬用人參よりダンマレンジオール-II の 12 位及び 6 位の水酸化を触媒する CYP716A47 及び CYP716A53v2、また、 β -アミリンの 28 位酸化を触媒する CYP716A52v2 が同定されている。今回分析した 3 種地下部のサポニン成分プロファイルと照らし合わせて、地下部で強く発現している cytochrome P450 (CYP450) および糖転移酵素 (GT) を検索したところ、それぞれ 69 遺伝子および 50 遺伝子が候補遺伝子として選別できた。今後は、これらを候補として更なる解析を進めていきたい。

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 4 件)

- (1) Ge Y.-W., Zhu S., Yoshimatsu K., Komatsu K. MS/MS similarity networking accelerated target profiling of triterpene saponins in *Eleutherococcus senticosus* leaves. Food Chem., 2017; 227: 444-452. (査読有)
- (2) Kita T., Komatsu K., Zhu S., Iida O., Sugimura K, Kawahara N, Taguchi H, Masamura N, Cai SQ. Development of intron length polymorphism markers in genes encoding diketide-CoA synthase and curcumin synthase for discriminating *Curcuma* species. Food Chem. 2016; 194: 1329-1336. (査読有)
- (3) Wang C. Q., Jia X. H., Zhu S., Komatsu K., Wang X., Cai S. Q. A systematic study on the influencing parameters and improvement of quantitative analysis of multi-component with single marker method using notoginseng as research subject. Talanta. 2015; 134: 587-595. (査読有)
- (4) Zhu S., Yu X. L., Wu Y. Q., Shiraishi F., Kawahara N., Komatsu K. Genetic and chemical characterization of white and red peony root derived from *Paeonia lactiflora*. J Nat Med. 2015; 69: 35-45. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) Zhu S. Integrated quality evaluation of herbal medicines based on genetic and chemical diversity. 江西省中医薬国際協力推進交流会 ; 2016, 11, 22 ; 南昌, 中国.
- (2) 葛 躍偉, 東田千尋, 朱 姝, 吉松嘉代, 小松かつ子. Effects of Oleanane-type Saponins from the Leaves of *Eleutherococcus senticosus* on Axonal Outgrowth. 第 33 回和漢医薬学会学術大会 ; 2016, 8, 27-28 ; 星薬科大学 (東京都品川区).
- (3) 朱 姝. 遺伝子解析を活用した薬用植物・生薬の資源探索と品質評価について. 薬用植物フォーラム 2016 ; 2016, 7, 12 ; つくば国際会議場 (茨城県つくば市).
- (4) Zhu S., Komatsu K. Genetic marker indexed quality evaluation of herbal medicines. The 2nd International Symposium for the Extension of

Multi-Purpose Natural Products ; 2015, May 28; Gyeongsan; South Korea.

- (5) Zhu S., He J. Y., Komatsu K. Evaluation of herbal medicines through integrated approaches. The JSPS-NRCT Follow-Up Seminar 2015 and 31st International Annual Meeting in Pharmaceutical Sciences. 2015, Jan 22-23; Bangkok, Thailand.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朱 姝 (ZHU Shu)

富山大学和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号 : 20377360