

令和元年5月8日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02494

研究課題名(和文) 甘草を中心とする重要マメ科薬用資源植物の統合ゲノム研究

研究課題名(英文) Integrated genomics on important medicinal plants in Leguminosae

研究代表者

齊藤 和季 (Saito, Kazuki)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：00146705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,300,000円

研究成果の概要(和文)：甘草はその安定供給が危惧される最も重要な生薬の代表である。そこで、最も上質とされるウラル甘草について、全ゲノムサイズの94.5%に相当する379メガベースのドラフトゲノム情報を構築し、34,445個のタンパク質をコードする遺伝子を見出した。さらに他の甘草種植物やマメ科の重要薬用植物についても、同様の手法でゲノム配列と関連情報を取得した。このように、薬用植物の統合ゲノミクスの研究基盤を提供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甘草は漢方処方7割に配合されている最も使用頻度の高い重要な生薬であるが、その供給はすべてが輸入であり、多くを中国に依存している。しかし、中国での甘草の輸出規制が始まり、その安定供給が深刻に危惧されている。本研究は、漢方処方に用いられる重要生薬の基原植物において初めてのゲノム配列決定であり、この分野の研究進展に大きく貢献した。特に、発表論文の一つは高被引用度トップ1%論文に選定され注目された。

研究成果の概要(英文)：Licorice is a representative of the most important herbal medicines whose availability is at stake. We have obtained 379 Mbp draft genome information equivalent to 94.5% of the total genome-size constructed for *Glycyrrhiza uralensis*, and the genes encoding 34,445 proteins were predicted. Furthermore, genome sequences and related information were acquired in the same way for other licorice species and an important medicinal plant of the Leguminosae family. Thus, we provided a research platform for integrated genomics of medicinal plants.

研究分野：天然資源系薬学、植物ゲノム機能科学、植物バイオテクノロジー

キーワード：薬用植物 植物二次代謝 ゲノム 甘草

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マメ科植物には甘草(カンゾウ)、葛根(カッコン)を初めとして生薬資源として重要な薬用植物が多く存在する。その中で、甘草は漢方処方7割に配合されている最も使用頻度の高い重要な生薬であるが、その供給はすべてが輸入でありそのうち7割を中国に依存している。

しかし、中国での甘草の輸出規制が始まり、その安定供給が深刻に危惧されている。また、主要成分であるグリチルリチンは医薬品のみならず食品添加物(天然甘味料)として利用も極めて大きな重要天然化合物である。従って、甘草の薬用成分生産や様々な形質を規定しているゲノム領域や遺伝子を同定するゲノム機能科学研究は、天然資源系薬学において最も重要な課題である。

### 2. 研究の目的

甘草はその安定供給が危惧される最も重要な生薬の代表であり、そのゲノム機能科学研究は天然薬用資源学において最も重要な課題の1つである。そこで、本研究の主要な目標の一つは、甘草についてドラフトゲノム配列を決定し、重要形質を決定しているゲノム領域や遺伝子の推定に資することである。

さらに甘草以外のマメ科の重要な薬用資源植物やその他の科の重要薬用植物についても、同様の手法で薬用成分の生産に関与している遺伝子を推定し、今後ますます重要性が増加する薬用資源植物の統合ゲノミクスの研究基盤を提供することを目標とする。

### 3. 研究の方法

下記の「4. 研究成果」の項目に併せて記載する。

### 4. 研究成果

(1) 医療用やグリチルリチン製造に用いられる実用的な甘草には複数種あるが、ウラル甘草(東北甘草)(*Glycyrrhiza uralensis*)が最もグリチルリチン含量が高く上質とされている。そこで、このウラル甘草の単一系統(308-19系統)を材料として、タイプの異なる高速シーケンサーを組み合わせて用いゲノムのDNA配列を解読した。解読したDNA配列を高速計算機で解析し、冗長性をなくし推定されているゲノムサイズの94.5%に相当する379メガベースのドラフトゲノム情報を構築した。表1に決定したドラフトゲノムの概要を示す。

(2) 構築したゲノム情報について、甘草のトランスクリプトーム情報や、他の植物の遺伝子情報を用いて遺伝子予測を行った結果、34,445個のタンパク質をコードする遺伝子を見出した。

(3) 続いて、ウラル甘草のゲノム情報と、すでに全ゲノムが解読されているマメ科植物のタルウマゴヤシ(*Medicago truncatula*)やヒヨコマメ(*Cicer arietinum*)のゲノム情報およびゲノム全域を比較解析した。その結果、薬効成分の一つであるイソフラボノイドの生合成に特異的に関わる3個の酵素遺伝子がクラスタを形成していることが分かった。これら3個の遺伝子は、CYP93C; 2-hydroxyisoflavanone synthase [EC:1.14.13.136], HI40MT; 2,7,4

-trihydroxyisoflavanone 4'-O-methyltransferase / isoflavone 4'-O-methyltransferase [EC:2.1.1.212 2.1.1.46], 7-IOMT; isoflavone-7-O-methyltransferase [EC:2.1.1.150]である。その遺伝子クラスタは、これらのマメ科植物のゲノムの約100kb~200kbにわたって、遺伝子の並びがよく保存されている領域中に形成されていた。

(4) さらに、グリチルリチンを含む有用化合物群の一つであるトリテルペン配糖体の生合成に関わる酸化酵素であるP450ファミリーと配糖化酵素であるUGTファミリーをコードする遺伝子群を甘草のゲノム情報から網羅的に探索し、それらの遺伝子構造と遺伝子発現を明らかにした。また、ウラル甘草のゲノムの少なくとも8カ所でP450ファミリーとUGTファミリーをコードする遺伝子が隣り合って存在していることを見出した。

(5) 本研究で得られたウラル甘草のドラフトゲノム情報によって、網羅的な遺伝子発現解析や系統間のゲノムDNAの違いを調べる際の参照(リファレンス)ゲノム情報が提供された。今後、分子育種による甘草の国内栽培化、生産性の向上、生薬としての機能改変のほか、薬効成分の生産に必要な有用遺伝子探索が加速すると期待できる。また、ゲノム情報に基づいて、生物活性化合物の生合成や代謝に関わる酵素遺伝子がライブラリ化されれば、植物由来の希少化合物や非天然化合物を人為的に合成する合成生物学の基盤技術の開発につながると期待できる。

(6) 本研究成果は、漢方処方に用いられる重要な生薬の基原植物において初めてのゲノム配列決定であり、この分野の研究進展に大きく貢献した。本成果は、植物科学の国際専門誌である

表1 ウラル甘草ドラフトゲノムの概要

染色体数	2n=16
推定ゲノムサイズ (フローサイトメーター)	ca. 401 Mb
配列全長	379 Mb (94.5%)
スキップフォルド数	12,528 (>1kb)
N50値	109kb
GC含量(%)	35.3%
推定遺伝子数	34,445

*The Plant Journal* に発表され ( 発表論文リスト ) 同誌当該号の表紙カバー論文に選定され注目を集めた。さらに、本論文はクラリベイト・アナリティクス社の被引用度調査によると高被引用トップ1%論文に選定され、植物科学分野に大きなインパクトを与えた。

( 7 ) さらに、上記論文の発表後にウラル甘草のゲノム配列情報をより高品質化するために、1分子リアルタイム DNA シークエンサー (PacBio) による追加的なゲノム配列の取得を行った。今後、最新のゲノム解析手法も応用してさらに精密なゲノム情報を構築する予定である。

( 8 ) ウラル甘草に次いで甘草の基原植物として重要なスペイン甘草 ( 西北甘草 ) (*G. glabra*)、新疆 ( しんきょう ) (*G. inflata*) について、まず実験的にゲノムサイズを決定した。次いで、これらの2種の甘草属植物のゲノムについて、イルミナプラットフォームによる配列取得、メイトペア・ライブラリーの配列取得、1分子リアルタイム DNA シークエンサー (PacBio) によるゲノム配列の取得、BioNano 社 1 分子 DNA ゲノムマッピングシステムデータを取得しつつある。さらに今後、染色体コンホメーションを解析する HiC 法も応用してゲノム解析を継続する予定である。同時に複数の組織についてトランスクリプトーム解析も行っている。

( 9 ) また、甘草と同じくマメ科に属し、生薬「苦参」の基原植物でありキノリチジンアルカロイドやイソフラボノイドを有効成分として含有するクララ (*Sophora flavescens*) についてゲノム関連研究を進めた。現在までに、ゲノムサイズをフローサイトメーターによって推定し、同時にゲノム配列データを取得しつつある。トランスクリプトーム解析はほぼ終了し発表済みである。

( 10 ) クララなどいくつかのマメ科植物が生産するキノリチジンアルカロイドの生合成経路の初発酵素遺伝子をシロイヌナズナに導入発現し、新規の生合成経路を作出する研究も継続し、学術誌に論文を投稿した。本研究では、遺伝子導入によって新規生合成経路が生まれて二次代謝産物の化学的多様性が拡張する過程について、植物ゲノムの進化に起因する可能性について考察した。

## 5 . 主な発表論文等

### [ 雑誌論文 ] ( 計 6 件 )

Amit Rai, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: A new era in plant functional genomics. *Current Opinion in Systems Biology*, **15**, 58-67 (2019) 査読有,  
<https://doi.org/10.1016/j.coisb.2019.03.005>

Mami Yamazaki, Amit Rai, Naoko Yoshimoto, Kazuki Saito: Perspective: functional genomics towards new biotechnology in medicinal plants. *Plant Biotechnology Reports*, **12**, 69-75 (2018) 査読有,  
[doi.org/10.1007/s11816-018-0476-9](https://doi.org/10.1007/s11816-018-0476-9)

Kazuki Saito: Development of Plant Metabolomics and Medicinal Plant Genomics. *YAKUGAKU ZASSHI*, **138**, 1-18 (2018) 査読有,  
<https://doi.org/10.1248/yakushi.17-00193>

Keiichi Mochida, Tetsuya Sakurai, Hikaru Seki, Takuhiro Yoshida, Kotaro Takahagi, Satoru Sawai, Hiroshi Uchiyama, Toshiya Muranaka, Kazuki Saito: Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume. *The Plant Journal*, **89**, 181-194 (2017) , 査読有 ,  
DOI:10.1111/tpj.13385

Amit Rai, Kazuki Saito, Mami Yamazaki: Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants. *The Plant Journal*, **90**, 764-787 (2017) 査読有,  
DOI: 10.1111/tpj.13485

Somnuk Bunsupa, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Lysine-derived Alkaloids: Overview and Update on Biosynthesis and Medicinal Applications with Emphasis on Quinolizidine Alkaloids. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, **17**, 1002-1012 (2017) 査読有,  
DOI: 10.2174/1389557516666160506151213

### [ 学会発表 ] ( 計 11 件 )

清水陽平, 大川結子, 佐藤大, 鈴木秀幸, Amit Rai, 齊藤和季, 山崎真巳: シロイヌナズナへのリジン / オルニチン脱炭素酵素遺伝子導入によるカダベリン代謝誘導 . 日本生薬学会第 65 回年会 ( 広島 ) ( 広島 . 平成 30 年 9 月 16-17 日 )

Kazuki Saito: Phytochemical genomics: from Arabidopsis to medicinal plants. The 3<sup>rd</sup> Conference of the International Society for Plant Molecular Farming. Helsinki Finland. June 11-13 2018.

Kazuki Saito: Phytochemical genomics-A basis for the future research of plant natural products chemistry. The 32<sup>nd</sup> International Symposium on Natural Products. Taichung, Taiwan. October 13-14 2017.

Kazuki Saito: Discovery of novel genes and metabolites through plant genomics and metabolomics - From Arabidopsis to specialized plants. Annual Conference of American

Society of Plant Biology 2017. Honolulu Hawaii, USA. June 24-28, 2017.  
Kazuki Saito : Phytochemical Genomics: A Basis for Redesign of Plant Natural Products Biosynthesis. International Symposium on Creation of Complex Functional Molecules by Rational Redesign of Biosynthetic Machineries. The 13<sup>th</sup> Annual Congress of The Pharmaceutical Society of Japan. Sendai Japan, March 24-27, 2017.  
Kazuki Saito: Phytochemical genomics - from a model plants to medicinal plants. 9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference 2016. Copenhagen, Denmark. July 24-27, 2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/idenshi/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山崎 真巳

ローマ字氏名：(YAMAZAKI, mami)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70222370

研究分担者氏名：ライ アミット

ローマ字氏名：(RAI, amit)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：大学院薬学研究院

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：60760535

研究分担者氏名：鈴木 秀幸

ローマ字氏名：(SUZUKI, hideyuki)

所属研究機関名：公益財団法人かずさDNA研究所

部局名：ゲノム事業推進部

職名：グループ長

研究者番号(8桁)：80276162

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：吉本 尚子

ローマ字氏名：(YOSHIMOTO, naoko)

研究協力者氏名：高橋 弘喜

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, hiroki)

研究協力者氏名：櫻井 哲也

ローマ字氏名：(SAKURAI, tetsuya)

研究協力者氏名：持田 恵一

ローマ字氏名：(MOCHIDA, keiichi)

研究協力者氏名：中林 亮

ローマ字氏名：(NAKABAYASHI, ryo)

研究協力者氏名：平川 英樹

ローマ字氏名：(HIRAKAWA, hideki)

研究協力者氏名：高上馬 希重

ローマ字氏名：(KOJOMA, mareshige)

研究協力者氏名：關 光

ローマ字氏名：(SEKI, hikaru)

研究協力者氏名：村中 俊哉

ローマ字氏名：(MURANAKA, toshiya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。