

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390030

研究課題名(和文) 我が国の代表的な薬用植物のディープ・トランスクリプトームとメタボロームの統合解析

研究課題名(英文) Integrated analysis of transcriptome and metabolome in Japanese medicinal plants

## 研究代表者

齊藤 和季 (SAITO, Kazuki)

千葉大学・薬学研究科(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) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本で生育する代表的な薬用植物について、ディープ・トランスクリプトーム解析と代謝産物解析を行った。次世代DNAシーケンサーを用いた大量のトランスクリプトームデータの取得とその解析により、重要なマメ科の生薬基原植物であるクララ(*Sophora flavescens*)とクズ(*Pueraria lobata*)について生薬成分の生合成に関する複数の遺伝子が推定できた。

研究成果の概要(英文)：We have conducted the deep transcriptome and metabolite analyses on the representative medicinal plants grown in Japan. By the transcriptomics analyses with a next-generation DNA sequencer, we have successfully assigned a number of genes presumably involved in the biosynthesis of pharmacologically-active ingredients in the Leguminous medicinal plants, *Sophora flavescens* and *Pueraria lobata*.

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：薬用資源 トランスクリプトーム メタボローム 二次代謝物

## 1. 研究開始当初の背景

次世代 DNA シークエンサーやメタボロミクス解析の技術進展により、統合オミクスを駆使したシステムゲノム機能科学が注目されている。特に、薬用植物、農作物、工業原料植物など植物の有用性を決めているのは、ポリケチド、フェニルプロパノイド、テルペノイド、アルカロイド、糖、アミノ酸、脂質などの代謝産物であり、植物の有する化学的多様性のゲノム基盤解明とその応用は、人口の爆発的增加とそれに伴う感染症の拡大、食料不足、地球温暖化など地球規模での喫緊の諸問題解決のために極めて重要なテーマである。

植物代謝産物の総数は 20 万~100 万種に達すると言われ、動物よりも 100 倍も化学的多様性が大きい。従って、その植物化学的多様性のゲノム基盤解明と応用(ファンクショナルファイトケミカルゲノミクス)は、植物遺伝子資源の有効利用にとって重要かつ急務である。

本研究グループは、従来主にモデル植物シロイヌナズナを用いてメタボロミクスを駆使した植物代謝産物生合成のゲノム機能科学に大きな成果を収めてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本の代表的で重要な薬用植物について、次世代シークエンサーによるディープ・トランスクリプトミクスと代謝産物の化学的解析の統合によって、これらの薬用植物の特徴的な薬用成分生産に関する鍵遺伝子を推定する。

さらに、遺伝子発現解析による推定機能の確認や異種生物での機能発現による遺伝子機能の同定と将来の合理的なエンジニアリングのための基盤的データの供給を目的とした。

## 3. 研究の方法

主に、薬用植物であるクララ (*Sophora flavescens*)、クズ (*Pueraria lobata*) について次世代シークエンサーを用いた RNA-Seq を行った。

クララでは、カルス、葉、花、茎、成熟した蕾、若い蕾、開花直前蕾、蕾の花茎、花の花茎の 9 種類、クズでは葉、成熟した根、若い根、根木部、茎の 5 種類の植物組織を用いた。それぞれの total RNA から、cDNA ライブラリーを作製し、Illumina (HiSeq 1000/1500) を用いて配列データを取得後、*de novo* アセンブルを行った。

NOISeq-sim (<http://bioconductor.org/biocLite.R>) を使用し、配列長とリード数で正規化した RPKM 値に基づき、各組織間で特徴的に発現している遺伝子を選抜した。

遺伝子オントロジー解析では BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 及び WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>) を用い、Fisher's exact test によって

検定した。

イソフラボン生合成経路におけるマッピングには、KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) を使用した。クズにおける代謝物解析では、各植物組織におけるダイジンとプエラリンの含有量について HPLC (HITACHI D7000 system) を用いた定量解析を行った。

半定量的 RT-PCR では、各植物組織より調製した total RNA より逆転写を行い、取得した cDNA を鋳型に用いた。また、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -アクトチンの発現量を解析した。

## 4. 研究成果

RNA-seq により取得した Raw sequence data をトリミングした後、DDBJ の SRA データベースにアップロードした (アクセス番号: クララ\_DRA003182; クズ\_DRA001736)。CLC (<http://www.clcbio.co.jp/>) を用いてアセンブルした後、CD-HIT-EST を用いて重複した contig を除いた。最終的にクズからは、83,041 個 (N50; 1,145 bp)、クララからは 83,325 個 (N50; 1,145 bp) の contig を取得し、更なる解析に使用した。なお、それぞれの GC 含量は、39.9%、39.3% であり、同じマメ科の *Glycine max* の 43%、*Medicago truncatula* の 40% とほぼ同じであった。配列相同性による遺伝子機能解析として、遺伝子オントロジー (GO) 解析によりクズ又はクララに特徴的な GO term を抽出した。クズでは細胞分裂 (GO: 0051301) と根毛伸長 (GO: 0048767) が抽出された。クズは成長速度の速い植物として知られているが、これらの GO term はこの特徴を反映したものであると考えられる。一方、クララでは原形質膜 (GO: 0005886) と細胞質 (GO: 0005737) の他にイソプレノイドの生合成経路の一つ MEP 経路 (GO: 0019288) が抽出された。クララは生理活性物質としてプレニル化フラボノイドを多く含有していることが知られていることから、MEP 経路が抽出されたことは非常に興味深い。

クズの各組織間で特徴的に発現している遺伝子を選抜するために RPKM に基づきペアワイズ比較を行ったところ、葉と成熟した根の比較において 1,408 個と最も多くの発現量の異なる遺伝子が検出された。興味深いことに、クズの生理活性物質として知られるイソフラボンの一つダイゼインの配糖体であるダイジン(ダイゼイン 7-O-グルコシド)とプエラリン(ダイゼイン 8-C-グルコシド)について葉と成熟した根における蓄積量を測定したところ、これらの代謝物は成熟された根でのみ検出された。従って、今回検出された 1,408 個の contig の中にプエラリン生合成に関する酵素遺伝子をコードするものが含まれている可能性が考えられる。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。

一方、クララでも同様に RPKM に基づくペ

アライズ比較を行ったところ、成熟した蕾とカルスの比較において 1,061 個と最も多くの発現量の異なる遺伝子が検出された。特にクララのカルスは他の植物組織と顕著に異なる遺伝子発現を示した。より詳細な解析のため、まずはクララの属するマメ科植物が生合成する特徴的な生理活性物質であるイソフラボンに着目して解析を進めた。取得した contig を KEGG pathway にマッピングしたところイソフラボン生合成経路に関する 13 個の酵素遺伝子について複数の contig がマッピングされた。特に 7 つの生合成ステップからなるダイゼインの生合成経路中に 34 個の contig がマッピングされた (Figure 1)。

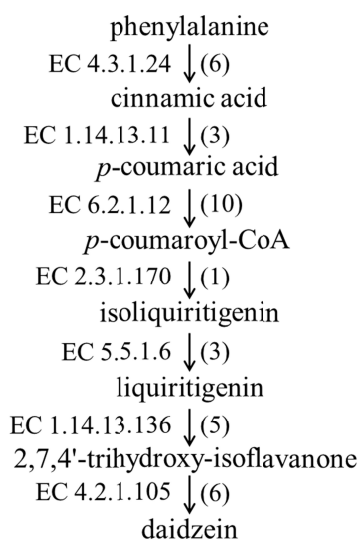


Figure 1. クララ由来 contig のダイゼイン生合成経路に対するマッピング。カッコの中はマッピングされた contig の数を示す。

また、クララにはキノリジジンアルカロイドの一つであるマトリン、オキシマトリンが豊富に含まれていることが知られている。加えて、当研究室では、*Lupinus angustifolius* よりキノリジジンアルカロイド生合成経路の最初の反応を触媒するリジン/オルニチンデカルボキシラーゼ (*La-L/ODC*) のクローニングに成功している (Bunsupa et al., 2012)。そこで、本研究において取得したクララの contig を探索したところ、*La-L/ODC* と 97.54% の一次配列相同性を示す contig c\_86767 を選抜することに成功した。c\_86767 の葉、茎、根における発現量について半定量 RT-PCR で解析したところ、葉で最も高く、次いで茎で発現が検出された。一方、根での発現は検出されなかった。このような傾向は *La-L/ODC* の発現パターンと同様であった。

マトリン及びオキシマトリンの生合成遺伝子は c\_86767 と同様の発現パターンを示すことが考えられるため、各植物組織における RPKM に基づく共発現解析を行った。その結果、4 つの contig が選抜された (Table 1)。これらの contig はキノリジジンアルカロイドの生合成に関与している可能性が考えられる。

特に c\_87044 は酸素添加酵素であるシトクローム P450 とアノテーションされていることから、マトリンからオキシマトリンへの酸化反応を触媒する生合成酵素であることが示唆された。

Table 1. c\_86767 と高い共発現パターンを示す contig。

| Contig ID | Annotation               | Pearson correlation coefficient with c_86767 |
|-----------|--------------------------|--|
| c_55306   | MLP-like protein         | 0.92   |
| c_87044   | Cytochrome P450          | 0.89   |
| c_87047   | Ripening related protein | 0.95   |
| c_13631   | Uncharacterized protein  | 0.99   |

RNA-Seq は経済効率的かつハイスループットはトランスクリプトーム解析としてゲノムが解読されていない植物、特に薬用植物の解析に最適である。同様の手法をニンニクの RNA-Seq 解析にも適用して部分的な結果を得た (未発表)。本研究では主にクズとクララの RNA-Seq と生理活性物質の情報を組み合わせた解析を行うことで、将来に向けた薬用植物の生合成経路解析の基礎を構築した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Rongchun Han, Hiroki Takahashi, Michimi Nakamura, Bunsupa Somnuk, Naoko Yoshimoto, Hideyuki Suzuki, Daisuke Shibata, Mami Yamazaki, Kazuki Saito: Transcriptome analysis of 9 tissues to discover in the biosynthesis of active ingredients in *Sophora flavescens*. Biol. Pharm. Bull. 査読有. in press (2015)

### 〔学会発表〕(計 7 件)

吉本尚子, 杉野由佳, 小寺幸広, 恒吉唯充, 齋藤和季: ニンニクにおける含硫二次代謝物生合成酵素群の発現部位の解析. 第56回日本植物生理学会年会. 2015年3月16-18日. 東京農業大学, 東京.

韓榮春, 中村道美, Bunsupa Somnuk, 山本浩文, 鈴木秀幸, 高橋弘喜, 吉本尚子, 山崎真巳, 齋藤和季: RNA-Seq analysis on 9 tissues of *Sophora flavescens* reveals putative genes involved in the biosynthesis of quinolizidine alkaloids and isoflavonoids, 日本生薬学会第61回年会福岡2014. 2014年9月13-14日. 福岡大学, 福岡.

韓榮春, 高橋弘喜, 中村道美, 吉本尚子, 鈴木秀幸, 柴田大輔, 山崎真巳, 齋藤和季: RNA-Seq Analysis on *Pueraria lobata* Ohwi. 日本薬学会第134年会, 2014年3月27-30日, 熊本.

K. Saito: Role of metabolomics in plant gene discovery and crop improvement. *Plant Gene Discovery & 'Omics' Technologies*. February 17-18, 2014. Vienna, Austria.

K. Saito: Metabolomics as a versatile tool for phytochemical genomics. *Singapore National University, Biology Colloquium*. January 24, 2014. Singapore.

K. Saito: Plant functional genomics based on metabolomics. *The 2<sup>nd</sup> International Symposium and Workshop on Functional Genomics and Structural Biology*. January 21 - 24, 2014. Selangor, Malaysia.

Kazuki Saito : Discovery of novel genes in plant secondary metabolism by integrated omics approach. *The 43<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Korean Society of Pharmacognosy*. December 6, 2012. Seoul, Korea.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/idensi/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

斉藤 和季 (SAITO Kazuki)  
千葉大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：00146705

### (2) 研究分担者

山崎 真巳 (YAMAZAKI Mami)  
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：70222370

吉本 尚子 (YOSHIMOTO Naoko)  
千葉大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号：10415333

鈴木 秀幸 (SUZUKI Hideyuki)  
公益財団法人かずさDNA研究所・バイオ研究開発部・主席研究員  
研究者番号：80276162  
(H25年度より)