

	くわはら ゆうすけ
氏名（本籍地）	桑原 佑典
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第379号
学位授与年月日	平成31年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生態システム生命科学専攻
論文題目	薬用植物のトランスクリプトーム解析、及びそのデータベース構築に関する研究
博士論文審査委員	（主査）准教授 平川 英樹 教授 柴田 大輔 教授 東谷 篤志 准教授 佐藤 修正

論文内容の要旨

背景

薬用植物は、様々な薬理作用を有する化合物を産生し、様々な医薬品の原料として用いられる重要な資源である。それらの薬用植物の品質を高め、かつ、安定的に栽培、供給するためには、必要とされる有用物質の生合成経路を明らかにすることが重要である。近年の技術革新により次世代シーケンサー（NGS）は飛躍的な発展を遂げ、ゲノム配列が明らかにされていない植物においても、NGS から得られた RNA-Seq データをアセンブルして転写産物の配列を調べることができる *de novo* トランスクリプトーム解析によってその植物が有する遺伝子を同定することが可能になり、国内外で様々な研究が行われている。本研究では、トウサイカチとジオウを対象としたトランスクリプトーム解析によって、①トウサイカチにおけるサポニン生合成経路の解明、②ジオウにおける根の肥大化の分子メカニズムの解明を行い、さらには、複数の植物種を対象としたトランスクリプトーム解析によって、③50 種に渡る薬用植物について取得した RNA-Seq データの解析による薬用植物のトランスクリプトームデータベースの構築を行うことを目的とした。

方法および結果

薬用植物のトランスクリプトーム解析では、葉や根など有用な化合物を産生する部位を中心に RNA を採取し、イルミナ社製シーケンサーにより得られた RNA-Seq リードに対して de Bruijn グラフアルゴリズムに基づく Trinity を用いて *de novo* アセンブリを実施した。得られたコンテイング配列のうち発現量の低い転写産物や短い isoform を除いた unigene についてタンパク質配列データベースに対する相同性検索を行い、その結果を元に Blast2GO を用いて遺伝子機能や EC 番号、Gene Ontology などを付与しアノテーションを行った。本研究ではトウサイカチやジオウをはじめとする 50 の植物種を対象としてトランスクリプトーム解析を行った。なお、全ての植物種に対して同じ手法で解析を行った。各解析についての方法および結果を以下にまとめた。

① トウサイカチにおけるサポニン生合成経路の解明

トウサイカチはマメ科の薬用植物の一種であり、抗がん作用や抗インフルエンザ作用など様々な薬理作用を有する。またその果実にはサポニンを多く含有することから、古くから石鹸の代用とされてきた。しかしながら、それらの薬用成分の生合成経路には不明な点が多く、それを解明することはトウサイカチのみならずサポニンを産生する薬用植物の高品質、高収率な栽培に繋がると期待される。我々は葉、果実、花など 9 つの器官から RNA を採取し、トランスクリプトーム解析を行なった。その結果、47,855 個の unigene が得られ、その 66% に当たる 31,717 個が既存のタンパク質配列と類似性を有しており、類似した配列が最も多かった植物は同じマメ科であるキマメ (*Cajanus cajan*) であった。9 つの器官における発現プロファイルを調べ、各器官で特異的に発現していた遺伝子について Gene Ontology エンリッチメント解析を行った結果、果実ではフラボノイド合成関連遺伝子と UDP-glucosyltransferase (UGT) が高頻度に見られた。一方、メタボロミクス解析を行った結果、トウサイカチに含まれるサポニン Gleditsioside I は果実に最も多く含まれていた。サポニンを含むトリテルペノイドは、シトク

ロム P450 によるヒドロキシル化と UGT による配糖化によってその骨格の多様性を増加させており、それらの遺伝子を同定することはサポニン合成経路の解明に重要である。取得した unigene にはサポニンの合成経路に関わることが知られている P450 に類似性があるものが 26 個、UGT に類似しているものが 10 個含まれており、そのうち P450 では 7 個、UGT では 1 個の unigene が果実で特異的に発現していたことから、それらをサポニン合成系に関わる候補遺伝子として推定した。

② ジオウにおける根の肥大化の分子メカニズムの解明

ジオウはゴマノハグサ科の薬用植物であり、その根は抗炎症作用、抗酸化作用などの薬理作用を有する。ジオウには主に国内で流通しているカイケイジオウと現在は国内の一部の地域のみで栽培されているアカヤジオウがあり、カイケイジオウは薬用部位である根がアカヤジオウよりも肥大化する。本研究では肥大化の程度が異なるアカヤジオウとカイケイジオウについて *in vitro* 培養物の葉と細根、そして、*in vitro* 培養物を培養土に植え出した後、約 50 日が経過した植物体（植え出し株）の葉、細根、肥大根のそれぞれを試料とし、トランスクリプトーム解析を行なった。アセンブルの結果、45,185 個の unigene が得られ、その 73% に当たる 33,014 個が既存のタンパク質配列と類似性を有しており、類似した配列が最も多かった植物はゴマ科であるゴマ (*Sesamum indicum*) であった。カイケイジオウの肥大根において発現が増加していた遺伝子群はデンプン合成、ショ糖やガラクトース代謝関連経路に関係するものがアカヤジオウよりも多く、フェニルプロパノイド合成系やイノキノリンアルカロイド合成系に関わる遺伝子群は両ジオウにおいて発現が減少したものが多かった。これらの現象はサツマイモなどの肥大根でも報告されており、より肥大化するカイケイジオウで顕著であったことからジオウにおける肥大化における重要なメカニズムの一つとして推測された。さらにストレス応答性遺伝子である KIN2-like gene のホモログの発現量が肥大化に伴い葉で増加しており、さらに qPCR での検証を行った。その結果から、KIN2-like gene が根の肥大化を葉でモニタリングできるサロゲートマーカーの候補として考えられた。

③ 50 種に渡る薬用植物についての遺伝子配列データベースの構築

トウサイカチとジオウを含む 50 種の薬用植物について得た RNA-Seq データと公共データベースから入手した 13 種の薬用植物の RNA-Seq データを同様の方法により unigene を構築した。さらにゲノム配列が解読された代表的な植物 54 種の遺伝子配列を加え、合計 117 の植物種についてデータベースの構築を試みた。そこで、約 220 万個の unigene と約 270 万個の遺伝子配列に対して OrthoFinder を用いてクラスタリングし、56,531 個のオルソロググループを得た。各オルソロググループにおける最長の配列に対してアノテーションを行った。現在、これらのアノテーションを格納し、各生物や属などで共通に保存された遺伝子を検索できる薬用植物トランスクリプトームデータベースを構築している。このデータベースは薬用植物の有用成分の合成経路の解明や有用遺伝子の検索などに幅広く活用されることが期待される。

論文審査結果の要旨

本研究では、薬用植物であり去痰剤や消炎剤などの薬効をもつトウサイカチと補血や強壮などの薬効をもつジオウのそれぞれで得られたトランスクリプトームデータに対して *de novo* アセンブルにより **unigene** を構築し、トウサイカチではサポニン生合成経路の解明、ジオウでは地上部で根の肥大化をモニタリングできるサロゲートマーカーの検出を行う。さらに 50 種の薬用植物についてそれぞれ **unigene** を構築し、13 種の薬用植物の転写産物配列とゲノム配列が解読された 54 種の植物の遺伝子配列を対象としてオルソログ解析とアノテーションを行い、データベースを構築することを目的とした。トウサイカチの研究では、葉や果実、花など 9 器官から得たトランスクリプトームデータに対して **unigene** を構築し、これまで不明であった薬効成分トリテルペノイドの生合成経路に関与する遺伝子群を推定し、トリテルペノイドのヒドロキシル化を行う 7 個のシトクロム P450 と配糖化を行う 1 個の **UDP-glucosyltransferase** が果実でサポニン生合成に関わる候補遺伝子として推定した。これによりトウサイカチのみならずサポニンを産生する薬用植物の高品質、高収率な栽培に繋がることが期待される。ジオウの研究では、根の肥大の程度が大きいカイケイジオウにおいてストレス応答性遺伝子 **KIN2-like gene** の発現量が肥大化に伴い葉で増加することを見出した。この結果は **qPCR** で確認され、**KIN2-like gene** が根の肥大化を葉でモニタリングできるマーカーの候補として挙げられた。根を掘り返すことなく葉で肥大化の程度を知ることができればジオウ栽培の効率化に繋がると期待される。データベースに関する研究では、約 220 万個の **unigene** と約 270 万個の遺伝子配列に対してオルソログ解析とアノテーションを行い、属や科で共通な遺伝子を調べ、薬用植物トランスクリプトームデータベースの構築に向けた準備を行った。これにより薬用植物の有用成分の生合成経路の解明や有用遺伝子の検索など広く活用されることが期待される。発表者は自身で **unigene** 構築などの解析手法を確立し、実データとの対応関係を見出しており、自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有していると判断された。従って、提出された本論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。