

ウコン栽培品種のマルチオミクス解析

| | | | |
|-----------|------|---------------------------|-----|
| (申請代表者) | 小野直亮 | 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 | 助教 |
| (所外共同研究者) | 金谷重彦 | 奈良先端科学技術大学院大学情報科学研究科 | 教授 |
| (所外共同研究者) | 有田正規 | 東京大学理学系研究科 | 准教授 |
| | | (現 国立遺伝学研究所生命情報研究センター 教授) | |
| (所内共同研究者) | 田中 謙 | 富山大学・和漢医薬学総合研究所 | 准教授 |
| | | (現 立命館大学薬学部所薬生薬学研究室 教授) | |

【要 旨】

ウコン(*Curcuma longa*)は古くより中国、インドを始めとするアジア全域で薬用、食用などさまざまな形で利用されて来た植物であり、カレーを始めとする食品のスパイスとして、また漢方薬の材料としてその根茎の粉末が用いられ、解毒、鎮痛、消化の促進などの効用があるとされている。この薬効成分としてポリフェノールの一種であるクルクミンが同定されているが、近年このクルクミンおよびその類縁体の持つ抗酸化作用、抗炎症作用、解毒作用などが注目され、健康食品、サプリメントなどへの商業的利用が活発となって来ている。それに伴い、クルクミンおよびクルクミン類化合物の含有量が高い品種の開発も進められ、いくつかの栽培品種が登録されている。

本研究では、沖縄産ウコンとその栽培品種「皇金」「赤陽」のサンプルを用い、クルクミン類合成の生化学反応を中心に、代謝物質の測定、遺伝子発現プロファイルを解析し、栽培品種間での代謝経路の差異を比較した。富山大での田中らによるメタボローム解析の結果を元に、奈良先端大の金谷らによる代謝産物データベースKNAPSAcKを利用し、小野、有田らが遺伝子発現解析を行い、クルクミン類の代謝経路の働きを分析した。

まず、質量分析機を用いて*Curcuma*属の品種それぞれにおける根茎の代謝物質の濃度分布を測定し、クルクミン類の含有量を比較したところ、ウコン野生株と栽培品種「赤陽」では、*curcumin*の含有量をもっとも高く50~70%を占めており、他のクルクミン類縁体の比率が低かったが、それに対し、春ウコン(*C. aromatica*)および栽培品種「皇金」では、その比率が逆転し、*demethoxy-curcumin*の比率が60~80%を占めるという形で二つのグループに大きく分けられるという結果が得られた。

クルクミン、およびクルクミン類化合物の生合成経路に関しては現在イネにおいていくつかの酵素が同定されているが、合成に使われる酵素は基本的に共通なため、生成物の量の違いは代謝経路における分岐比の違いに由来すると考えられる。そこで、次世代シーケンサーを用いたcDNA解析をもとに遺伝子発現プロファイルを解析し、代謝経路における酵素群の発現パターンの差異を検出することを試みた。その結果、クマル酸CoAからクルクミン類に分岐する反応を司る*diketide-CoA synthase*と、*diketide-CoA*からクルクミン類への反応を司る*curcumine synthase*の発現量の比率が、両グループの間で逆転していることが確かめられた。これらの結果から、クマル酸合成の下流における*diketide-CoA synthase*および*curcumine synthase*の発現量の違いが代謝フラックスの分岐比の差異をもたらし、生成されるクルクミン類の成分比を決定していると結論づけられる。

背景・目的

ウコン (*Curcuma longa*) は古くより中国、インドを始めとするアジア全域で薬用、食用などさまざまな形で利用されて来た植物である。生姜に似たその根茎を乾燥させ、粉末としたものが主として利用され、カレーを始めとする食品のスパイスとして、着色料、染料として、また漢方薬の材料としても利用され、解毒、鎮痛、消化の促進などの効用があるとされている。この薬効成分としてポリフェノール的一种であるクルクミンが同定されているが、近年このクルクミン、及びその類縁体であるクルクミノイドの持つ抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用などの生理活性が着目され、健康食品、サプリメントなどへの商業的利用が活発となって来ている。それに伴い、クルクミノイドの含有量が高い品種の開発もすすめられ、いくつかの栽培品種が登録されている。また、アジアでは *C. longa* を始めとして春ウコン (*C. aromatica*)、紫ウコン (*C. zedoaria*) などのさまざまなウコン属の品種が利用されており、それぞれ含有するクルクミノイドの構成量に特徴があることが知られている。クルクミノイドはポリフェノール類に分類され(図 1)メキシ化の部分に違いがある化合物である。

本研究では、細胞内のクルクミン合成経路の働きを理解することを目的に、ウコンとその栽培品種 (cv) 2 種、及び春ウコンの合わせて 4 種類; *C. longa* (LN), *C. longa* cv Sekiyou (SK), *C. longa* cv Ougon (OU), 及び *C. aromatica* (AR) の根茎のサンプルを採集し、ガスクロマトグラフィー質量分析機 (GC-MS) を用いたクルクミノイドの含有比率の定量を行うとともに、クルクミン合成経路の酵素の発現解析を行った。

遺伝子発現解析には、次世代シーケンサー(NGS)を用いた網羅的な cDNA 配列解析をもとにした遺伝子発現プロファイルを求める手法である RNA-seq の手法を用いた。RNA-seq の手法ではまず cDNA をランダムに断片化した短い(本実験のプロトコルでは 100 塩基対)配列として読み、その断片を既知の遺伝子配列にアライメント(マッピング)することで各遺伝子に対応する断片の出現頻度を求める。本研究で対象としたウコン属の場合のように近縁種で全ゲノムが解析されているようなモデル生物がまだいない場合は、断片化される前の cDNA の遺伝子配列を推定するため、まず NGS によって得られた断片配列をつなぎ合わせて再構成(アセンブル)する。そして、得られた配列に対して改めて断片をマッピングしていくという手順になる。本研究では Grabherr らが開発し、公開されているソフトウェアである Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net>) を用いて配列の再構成、およびアライメントされた断片の頻度の解析を行った。

一般の RNA-seq の方法では、アセンブルによって得られた全ての参照配列を対象として断片の配列をマッピングし、マップされた断片の本数をもとに発現量を求める。しかし、この方法では複数の遺伝子に部分的に共通な、あるいはよく似た配列があった場合、その断片は配列を共有する遺伝子にランダムに分配される形になり、個々の遺伝子の発現量は低く見積られる傾向がある。また、NGS によって得られた短い配列をもとにしたアセンブルでは、アセンブルの際に元の配列の推定にエラーが入ることで本来存在していない配列や誤った配列が参照配列とされてしまうことも起こりえる。その結果、正しい遺伝子にマップされるべき断片が他の参照配列にマップされてしまって分散されるため、本来の遺伝子発現量よりも値が小さくなる。このような発現解析では対象の遺伝子の発現量が低い場合、生物学的、実験的、また解析アルゴリズムによるノイズの影響が大きくなり発現量の変化などを解析することが難しくなる。そのため、本研究では、アセンブルによって得られた遺伝子配列からまず先にクルクミノイド合成経路に関わる酵素群の遺伝子と相同なものを選び出し、それを参照配列として断片の配列をマッピングするという手順を用いた。この方法では、解析の対象となる遺伝子群、本研究の場合ではクルクミノイド合成経路に含まれる遺伝子の配列にマップされる断片の数は、遺伝子の選択を行わずにアセンブルされた配列全体にマップした場合と比べて数倍～十数倍大きくなる。これは、通常の方法ではアセンブルのエラーや相同な遺伝子の存在により複数の参照配列に分散してマップされていた断片が、あらかじめ選択された遺伝子に集約してマップされたことによる。この効果により、発現量の値が大きくなることで、実験的なノイズに対する発現量の値の比率、S/N 比が高くなり、より詳細な解析が可能となった。

クルクミンはその合成経路はフェニルアラニンから出発してクマロイル-CoA を経由し、ジケタイド CoA 合成酵素(DCS)、クルクミン合成酵素(CURS)の働きによって合成されること、また、クルクミノイドはこの経路の途中で分岐することによって合成されることが明らかになっている。3 種類のクルクミノイドの合成の際には同じ酵素 DCS、CURS が関与していると考えられている。すなわち、反応の基質にクマロイル CoA、フェルロイル CoA のどちらが用いられるかによって、作られるクルクミノイドの種類が異なってくる。本研究ではこれらの酵素の働きと生成されるクルクミノイドの含有量の変化について分析した。

結果・考察

まず、クルクミノイドの含有量の GC-MS による測定の結果では、図 2A 左のグラフのように、4 種の間でクルクミノイドの比率に大きく違いがあることがあきらかになった。Ougon は *C. longa* の栽培品種とされているが、デメキシクルクミンの含有量がクルクミンより高く、*C. zedoaria* などの系統に近いのではないかと推測される。100mg の根茎あたりのクルクミノイドの含有量は Sekiyou が最も高く 219.5 μ g、Ougon が 168.8 μ g、ついで *C. longa* が 46.5 μ g、*C. aromatica* が 25.0 μ g の順であった。

次に、クルクミノイド合成経路の発現量を解析したところ、図 2B のようになった。サンプル数が少ないため、株間の遺伝子発現量の違いを直接統計的に比較するのは困難であるため、クルクミンを最も多く合成する方の種 Group1; *C. longa*、*C. longa* cv Sekiyou とデメキシクルクミンを最も多く合成する方の種 Group2; *C. aromatica*、*C. longa* cv Ougon との二つの群にわけて発現量を比較した。このグループ間で発現量の相対変化を比較したところ、もっとも差異の大きかった遺伝子は DCS で、Group2 のほうが DCS の発現量が高かった。一般に代謝経路上で連続している反応を触媒する酵素は、機能的に関連が高いことから、発現制御の機構に共通の部分が多く、発現量に相関があることが知られている。今回の解析では、このような経路上の関連を抽出するため、経路上の連続する遺伝子をセットとして、統計解析を行った。すなわち、まず発現経路の最初の 2 つの酵素を選び、その遺伝子の発現量に Group1,2 の間で有意な差があるかどうかを比較する。

われわれの RNA-seq 解析方法を用いてウコン属 4 種の根茎におけるクルクミン合成経路の遺伝子発現解析を行い、クルクミノイドの含有量との比較を行ったところ、Group1 では Group2 に対して、CURS1 および CURS2 の二つの遺伝子の発現量が有意に高いという結果が得られた。図 2 から分かるように、DCS はクマロイル CoA、フェルイロル CoA のそれぞれからクルクミノイドへ分岐する反応を触媒している。

図 2C, 2D に、GC-MS 解析、遺伝子発現解析の結果から予想されるクルクミノイド合成経路の振る舞いを示す。Group1 では DCS の発現が低いことからフェニルアラニンからのフラックスはクマロイル CoA から分岐するよりもフェルイロル CoA まで進み、フェルロイル CoA のプール量、細胞内の濃度が高くなっていると考えられる。すると、DCS によって触媒される反応もフェルイロル CoA を基質とするものが多くなり、フェルロイルアセチル CoA の濃度もクマロイルアセチル CoA に比べて高くなると考えられる。その結果、CURS の反応としてはフェルロイル CoA とフェルロイルアセチル CoA を基質とするクルクミンの合成が最も多くなっていると考えられる。一方、Group2 では DCS の発現量が高く、クマロイル CoA からクマロイルアセチル CoA に流れるフラックスが、フェルイロル CoA に向かう反応よりも比較的高くなっている可能性が高い。そのことにより、クマロイルアセチル CoA の濃度がフェルロイルアセチル CoA よりも高くなっていると仮定すれば、結果として、デメキシクルクミンの合成に流れる反応のフラックスが高くなっていると説明できる。また、どの株においても CURS、CURS3 の発現が低いことは、ビスデメキシクルクミンの蓄積量が最も低いことと一致している。

この結論を確認するため、中間代謝物質であるクマロイル CoA、フェルイロル CoA から補酵素 A を除いたクマル酸、フェルラ酸の濃度を *C. longa* 及び Ougon の二種で定量したところ、*C. longa* ではクマル酸よりもフェルラ酸の濃度が高かったのに対し、Ougon ではクマル酸の濃度が高くなっていた。クマル酸、フェルラ酸の濃度が、クマロイル CoA、フェルイロル CoA の濃度に比例すると仮定すると、この測定結果は発現解析から予測されたフラックスの分布とも一致する。

また、クルクミノイド全体の含有量の違いを説明できる遺伝子発現の差異があるかどうか、Group1,2 の代わりに Sekiyou, Ougon と *C. longa*、*C. aromatica* の組み合わせでも発現量の統計的な比較を行ったが、有意な遺伝子のセットはみつからなかった。これらの種におけるクルクミノイドの総生成量の違いは、おそらく代謝のもっとも上流、あるいは根茎以外の場所での代謝が大きく支配しているのではないだろうかと考えられる。

結論

GC-MS をもちいてウコン属 4 種の根茎におけるクルクミノイド生成量を測定し、さらに RNA-seq 解析を用いてこの 4 種のクルクミン合成経路の遺伝子発現解析を行ったところ、クルクミンを多く合成する種; *C. longa*、*C. longa* cv Sekiyou ではデメキシクルクミンを最も多く合成する種; *C. aromatica*、*C. longa* cv Ougon に対して、DCS の発現量が低く、CURS の発現量が高いという有意な傾向が見られた。代謝経路上でこれらの遺伝子の発現量の違いと、代謝物質濃度の違い

を会わせて比較したところ、クミン属の株間でのクルクミノイドの生産量の違いをよく説明する結果となった。代謝解析と遺伝子発現解析を対応させ、代謝経路モデルと比較するこのような方法は、植物の有効成分を生産するさまざまな二時代謝物の合成経路の理解と分析において今後有効になっていくと期待される。

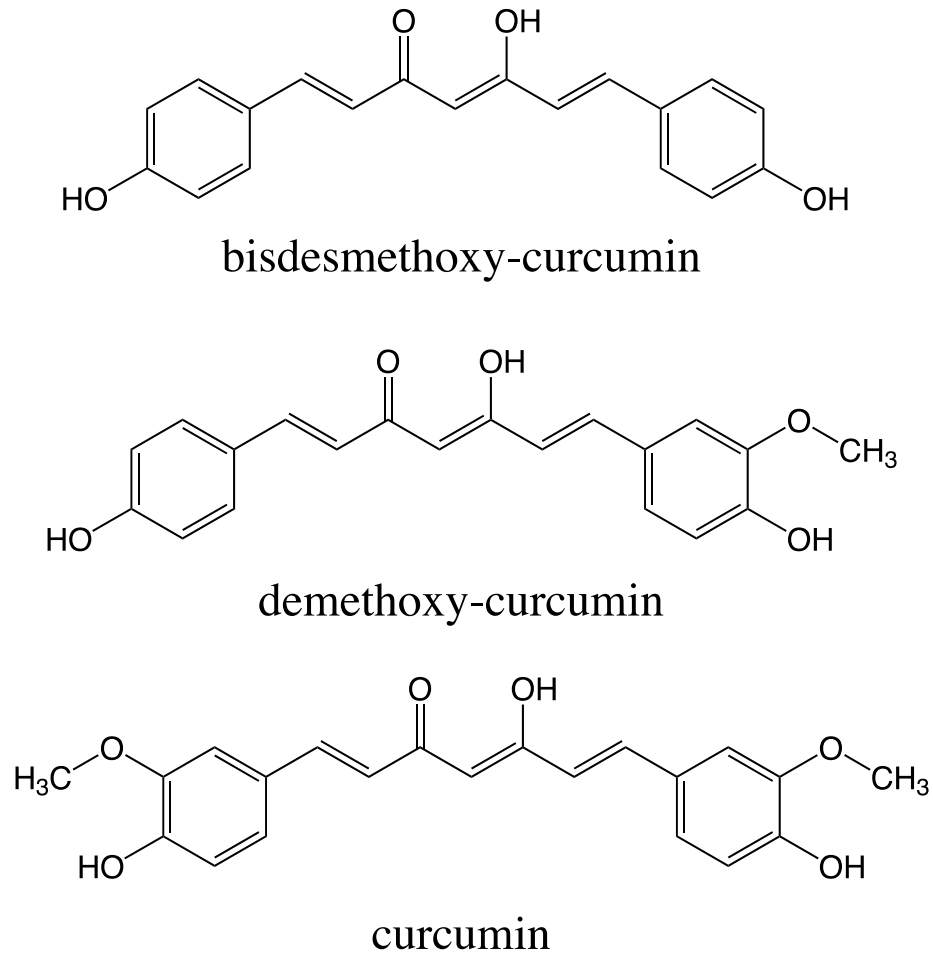


図1. クルクミノイドの構造

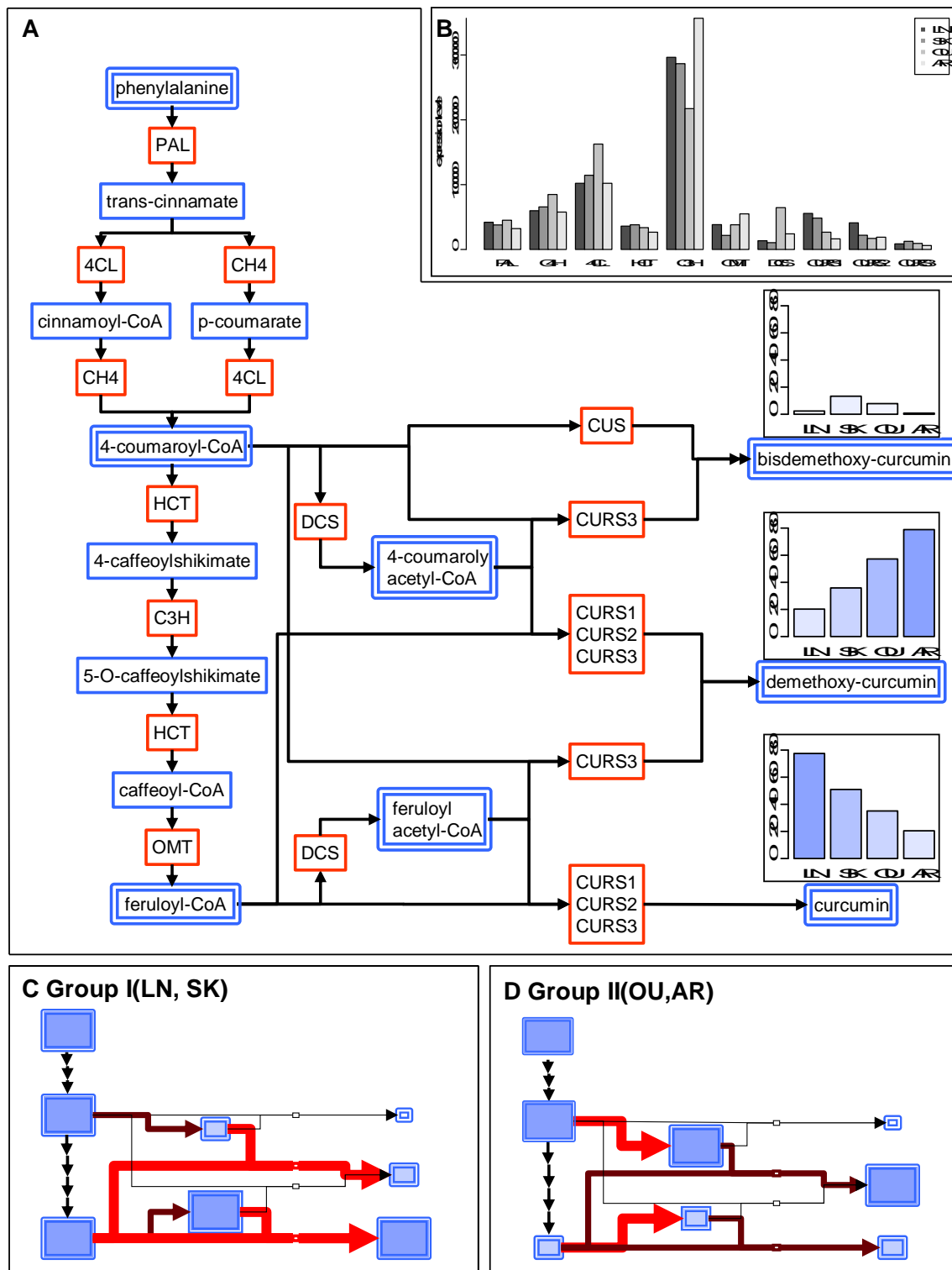


図2 A 代謝経路とクルクミノイド含有比。B 各遺伝子の発現量。C, D, 予想される中間代謝物質濃度と反応経路